

UNTERSUCHUNG DER WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN FG-
HELIX UND DER PROSTHETISCHEN GRUPPE IM OXY-
HÄMOGLOBIN DURCH RESONANTE RAMANSTREUUNG

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Physik/Elektrotechnik
der Universität Bremen

vorgelegt von

DÖRTE WEDEKIND

Diplom-Physiker

Gutachter:

Prof. Dr. W. Dreybrodt

Bremen

Prof. Dr. A. Mayer-Heinricy

Juni 1985

Das Promotionskolloquium wurde am 15.7.1985 durchgeführt.

Die Prüfer waren:

Prof. Dr. Wolfgang Dreybrodt

Prof. Dr. Adalbert Mayer-Heinricy

Prof. Peter Ryder, Ph.D.

Prof. Dr. Wilfried Staudé

Abstract

Measurement of the depolarization ratio in Resonant Raman Spectroscopy is a suitable tool to detect haem-apoprotein interactions. The depolarization ratio (DPR) of the 1375 cm^{-1} and the 1638 cm^{-1} -line of oxyhaemoglobin shows strong dispersion in the region between α - and Soret-band, which is drastically dependent on the pH-value and Cl^- -concentration of the solution.

Dispersion is caused by symmetry classified distortions of the haem transforming like A_{1g} , B_{1g} , A_{2g} , and B_{2g} in the ideal D_{4h} -symmetry. Using a 5th order time dependent perturbation theory of Raman scattering we are able to fit our experimental data. The obtained fitting parameters are linearly related to distortions of the haemgroup. Their variation with the pH-value is produced by protonation processes of the titrable groups in the protein.

Oxyhaemoglobin has been examined in two modified forms, i.e. BME-oxyHb and NES-oxyHb, and for Cl^- -concentrations between 0.08 and 1 Mol/l. The pH-value ranged from pH 5.5 to pH 9.0.

BME is covalently bonded to Cys F9(93) β and His FG4(97) β , thus reducing drastically the flexibility of the FG-helix. This causes absence of the pH-dependence of the oxygen-affinity and of the dispersion of the DPR.

NES bonded covalently to Cys F9(93) β forms a titrable H-bond to His FG4(97) β . The DPR-dispersion exhibits strong pH-variations.

We deduce from the pH-dependency of the fitting parameters pK-values of the titrable groups of $\text{pK} = 8.2, 6.8, \text{ and } 6.2$ for high Cl^- -concentrations and $\text{pK} = 7.8, 6.6, \text{ and } 5.8$ for low Cl^- -concentrations.

Comparing our results with those of NMR and kinetic measurements, we conclude, that the pK-value of 7.8 can be related to His HC3(146) β or to His FG4(97) β . The pK-value of 5.8 can

be related to His F8. Further we suggest, that the $pK=6.6$ reflects a strong influence of histidine residues on the conformation of Tyr HC2(145) β . Alternation of this conformation varies the H-bond between Tyr HC2(145) β and Val F9(98) and affects the ligand affinity of the molecule.

Our measurements support the dominant role of the FG(β)-helix for the functional properties of haemoglobin.

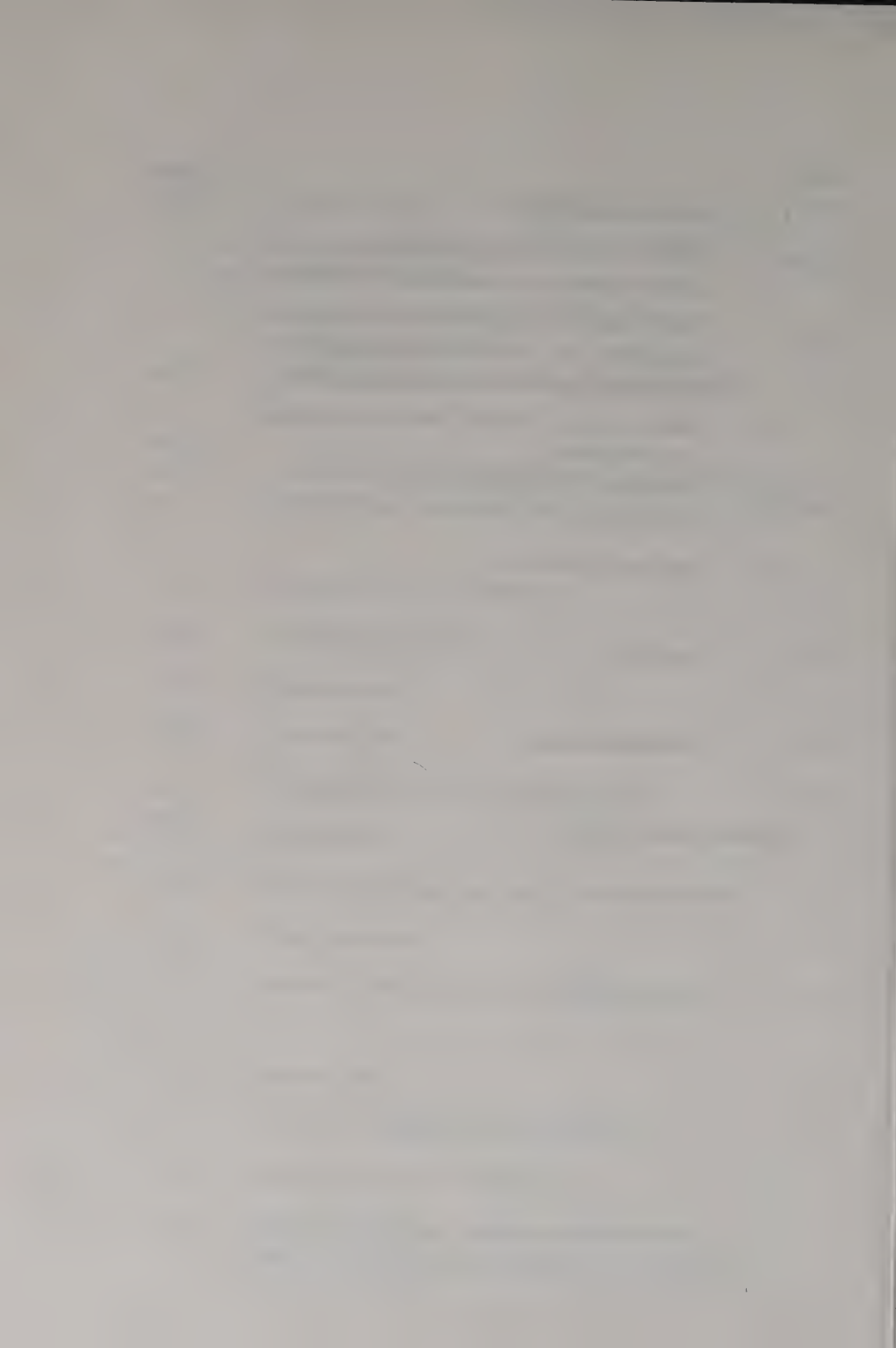
Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung	1
1. Hämoglobin	4
1.1. Einführung	4
1.2.1. Aufbau des Hämoglobins	4
1.2.2. van der Waals-Kontakte	6
1.2.3. Wasserstoffbrückenbindungen	8
1.2.4. Salzbrücken	8
1.2.5. Hydrophobe Wechselwirkungen	8
1.3.1. Sauerstoffbindung	9
1.3.2. Kooperativität. Das Monod-Wyman-Changeux Modell	11
1.3.3. Bohreffekt	13
1.3.4. Bohreffekt und Kooperativität, das stereochemische Modell von Perutz	14
1.4.1. Modifizierte Hämoglobine	16
1.4.2. Chlorid-Konzentration	17
2. Resonanter Ramaneffekt	21
2.1. Klassische Beschreibung des Polarisierbarkeitstensors	21
2.2.1. Quantenmechanische Beschreibung des Polarisierbarkeitstensors	23
2.2.2. Erzeugung eines zweiten Phonons	27
2.3.1. Elektronische Zustände im Porphyrin	30
2.3.2. Konfigurationswechselwirkung - Four Orbital Modell	30

	Seite
2.4.1. Ramanstreuung in Hämoglobin	33
2.4.2. Symmetrieklassifizierte Verzerrungen in der Hämgruppe	36
2.4.3. Berechnung des vollständigen Polarisierbarkeitstensors	38
2.4.4. Statische Verzerrungen in der Hämgruppe	39
3. Berechnung unterschiedlicher Titrationszustände	40
4. Experiment und Ergebnisse	45
4.1. Präparative Methode	45
4.2. Meßapparatur	47
4.3. Fitprogramm	50
4.4. Ramanspektren des Oxyhämoglobins	50
4.5. Meßprogramm	53
4.6. Depolarisationsgrad und Anregungsprofile	53
4.7. Fitkonstanten	64
4.8. pH-Wert-Abhängigkeit der Fitparameter	65
5. Diskussion	78
5.1. Gültigkeit des 4-Orbital Modells	78
5.2. Kombinations- und Obertöne	79
5.3. Unterschiedliche Kopplungsmechanismen für die Normalschwingungen bei 1375 cm^{-1} und 1638 cm^{-1}	79

	Seite
5.4. BME-Oxyhämoglobin	82
5.5.1. Einfluß der Chloridkonzentration auf die statischen Verzerrungen der Hämgruppe	83
5.5.2. Vergleich der Ramandaten mit Daten aus optischen und kinetischen Messungen - ein neues Modell für den Bohreffekt -	85
5.5.3. Vergleich der Raman- und Kinetikdaten mit NMR-Daten	93
5.5.3.1. Ergebnisse von Russu et al.	93
5.5.3.2. Ergebnisse von Perutz et al.	95
5.6. NES-Oxyhämoglobin	97
 6. Ausblick	 99
 7. Zusammenfassung	 102
 Literaturverzeichnis	 105



Einleitung

Die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins nimmt mit wachsender Protonenkonzentration zwischen pH 9.0 und pH 6.0 ab. Umgekehrt gibt Hämoglobin bei der Sauerstoffaufnahme Protonen ab und nimmt sie bei der Sauerstoffabgabe auf. Dieses Verhalten, 1904 von Bohr entdeckt, wird als alkalischer Bohreffekt bezeichnet. Der Bohreffekt ist physiologisch relevant für den Sauerstofftransport von der Lunge in das Gewebe und den Abtransport des Kohlendioxids. Der Bohreffekt tritt nur im tetrameren Hämoglobin auf. Er wird durch ein kompliziertes Zusammenspiel der Untereinheiten des Proteins, das für die Abgabe bzw. die Aufnahme der Protonen zuständig ist, und den prosthetischen Hämgruppen, verantwortlich für die Sauerstoffbindung, verursacht.

Nachdem Perutz (1968) durch Röntgenstrukturanalyse die Stereochemie des Hämoglobins weitestgehend geklärt hatte, stellte sich die Frage, welche Aminosäure die Protonenabgabe bzw. -aufnahme ändert und wie die Information darüber an das Häm weitergeleitet wird. Insbesondere wird dabei der Bruch der Salzbrücke zwischen His HC3(146) β und Asp FG1(94) β durch die Oxygenierung und die Rolle der FG-Helix diskutiert (Perutz et al., 1970, 1972, 1984, 1985; Russu et al., 1980, 1982; Kilmartin et al., 1973, u.v.a.). Erschwert wird die Diskussion durch Ergebnisse, denen unterschiedliche Meßbedingungen zugrunde liegen. Röntgenstrukturuntersuchungen finden am Kristall statt, NMR und Absorptionsmessungen in Hämoglobininlösungen mit unterschiedlichen Cl^- - und Phosphatkonzentrationen.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, mit Hilfe der resonanten Ramanspektroskopie (RRS) einen Einblick in die Funktionsweise des Hämoglobins zu gewinnen, wobei insbesondere die Chloridkonzentration berücksichtigt wurde. Hämproteine sind für die RRS besonders gut geeignet. Die Hämgruppe besitzt Absorptionsbanden oberhalb 380 nm. Das Apoprotein hingegen absorbiert im ultravioletten Bereich. So ist es möglich, im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 600 nm das Ramanspektrum der Hämgruppe ohne Überlagerung des schwächeren Spektrums des Apoproteins zu beobachten.

Messungen der Anregungsprofile und der Depolarisationsgrade für die Ramanlinien bei 1375 cm^{-1} und 1638 cm^{-1} des Ramanspektrum des Oxyhämoglobins zeigen im Frequenzband zwischen Soret- und α -, β -Banden eine Dispersion (Schweitzer et al. 1982). Diese Dispersion wird durch die Störung der D_{4h} -Symmetrie der Hämgruppe durch Seitengruppen und Apoprotein verursacht. So ist es möglich, durch gezielte Beeinflussung des Apoproteins eine Veränderung des Polarisierbarkeitstensors der Hämgruppe und somit der Hämgruppe selbst festzustellen.

In der theoretischen Behandlung des Polarisierbarkeitstensors, ausgehend von Loudon (1979), Peticolas et al. (1970) und Collins et al. (1973) in fünfter Ordnung zeitabhängiger Störungstheorie (Schweitzer-Stenner und Dreybrodt, 1985), stehen die Komponenten dieses Tensors in linearer Beziehung zu symmetrieklassifizierten Verzerrungen der Hämgruppe aus der D_{4h} -Symmetrie.

Die Dispersionskurven des Depolarisationsgrades und der Anregungsprofile können mit diesem Ansatz mittels eines Computerfitprogramms gleichzeitig mit einem Satz von Fitkonstanten angepaßt werden. Da die Fitkonstanten die Dispersionskurven beschreiben, reagieren diese Fitkonstanten genau wie die Dispersionskurven auf Veränderungen des Hämoglobins. So wird es möglich, aus dem pH-abhängigen Verhalten der Fitkonstanten pK-Werte von Aminosäuren zu ermitteln die wesentlichen Einfluß auf die Hämgruppe und somit auf die Sauerstoffaffinität haben.

Schweitzer (1983) untersuchte bereits die pH-induzierten Verzerrungen an der prosthetischen Gruppe im Hämoglobin, ohne dabei besonders auf die Chloridkonzentration einzugehen. In dieser Arbeit soll speziell der Einfluß der Chloridkonzentration auf die pH-induzierten Verzerrungen untersucht werden, da bekannt ist, daß diese den Bohreffekt verändert (de Bruin 1973) und damit den pK-Wert einiger Aminosäuren verschiebt.

Außerdem wird durch chemische Modifikation des Hämoglobins im FG-Bereich der β -Untereinheit mit Bis(maleimido-methyl)-ether und N-ethylmaleimid gezeigt, welche wesentliche Bedeutung dieser Abschnitt des Hämoglobins für die Einkopplung von Störungen aus anderen Bereichen des Proteins in die Hämgruppe besitzt.

1. Hämoglobin

1.1. Einführung

Im folgenden Kapitel wird zuerst ein kurzer Abriss über den Aufbau des Hämoglobins gegeben. Dann werden die Eigenschaften des Hämoglobins, Kooperativität und Bohreffekt beschrieben und anhand von Modellvorstellungen erklärt. Dabei wird insbesondere auf die Rolle einzelner Aminosäuren und ihrer Bindungen eingegangen. Weil diese auch in der späteren Diskussion eine Rolle spielen, wird der Einfluß chemischer Modifikationen auf diese Bindung und somit auf die Hämoglobinfunktion beschrieben. Anschließend wird die Rolle der Chloridkonzentration in bezug auf das Verhalten einzelner Aminosäuren in Zusammenhang mit dem Bohreffekt behandelt. Der Chloridkonzentration wurde bei früheren Messungen nicht genügend Aufmerksamkeit gewidmet. So führten Messungen mit unterschiedlichen Chloridkonzentrationen auch zu unterschiedlichen Ergebnissen, was dann zu nicht vollständigen Interpretationen dieser Ergebnisse führte (Kilmartin, 1973).

Das Verhalten der chemischen Modifikationen wurde ebenso wie das für unterschiedliche Cl^- -Konzentrationen in Abhängigkeit vom pH-Wert durch die Messung der Dispersion des Depolarisationsgrades und der Intensitätsprofile untersucht.

1.2.1. Aufbau des Hämoglobins

Das Hämoglobinmolekül ist ein Tetramer. Die vier Untereinheiten bestehen aus je zwei α - und zwei β -Ketten. In jeder dieser vier Untereinheiten ist die prosthetische Gruppe, das Protoporphyrin IX, eingebunden, s. Abb. 1a, b. Eine feste Bindung zwischen Apoprotein und Hämgruppe besteht zwischen dem proximalen Histidin einer Untereinheit und dem zentralen Eisenatom der Hämgruppe. Die sechste Bindungsstelle des Fe (II) bleibt so für die Sauerstoffbindung frei. Jede Untereinheit selbst besteht aus einer α -Helix, die von den sog. Random-coil-Strukturen unterbrochen wird. Die Random-coil-Strukturen zeichnen sich durch eine

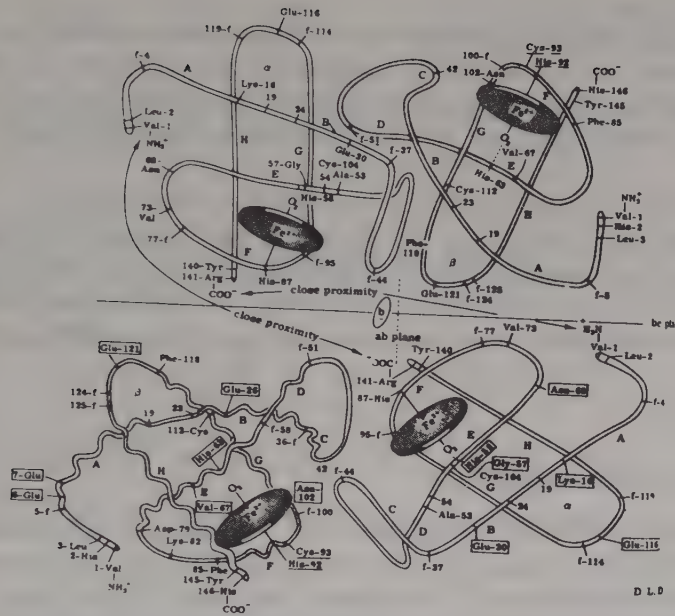


Abb. 1a: Quartärstruktur des Hämoglobins (Dolphin 1978)

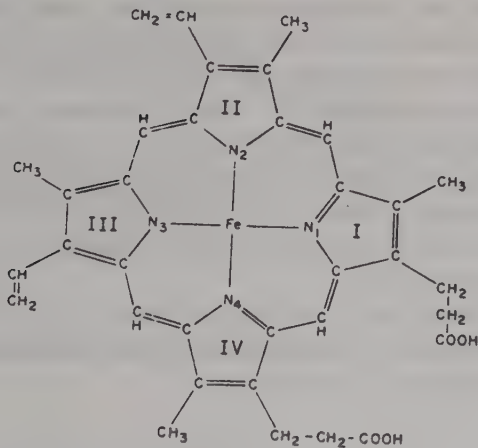


Abb. 1b: Protoporphyrin IX

höhere Beweglichkeit gegenüber den α -helicalen Bereichen aus (Frauenfelder, 1979). Sie haben deshalb eine Schlüsselrolle für die Dynamik des Hämoglobins. Die vier Untereinheiten werden durch van der Waals-Kontakte und Salzbrücken miteinander verbunden.

Da Bohreffekt und Kooperativität nur durch Veränderung der Quartär- und Tertiärstruktur des Moleküls hervorgerufen werden können, ist die Kenntnis über die Veränderung von van-der-Waals-Kontakten sowie die Entstehung von Salzbrücken und Wasserstoffbrücken für das Verständnis der Funktion des Hämoglobins unerlässlich.

1.2.2. van-der-Waals-Kontakte

Die meisten Kontakte im Hämoglobin, α - β -Kontakte, Apoprotein-Porphyrin-Kontakte, sind van der Waals-Kontakte. Sie sind zwar nur von der Größenordnung 1-10 KJ/Mol (Hofacker, 1978), aber für die Gesamtenergie ist ihre Zahl entscheidend. So gibt es allein schon sechzig Kontakte zwischen Apoprotein und prosthetischer Gruppe.

van der Waals Kräfte wirken zwischen zwei neutralen Atomen oder Molekülen. Aufgrund der Nullpunktsenergie der Kerne fluktuieren die Elektronen in einem elektrisch neutralen Atom, dabei kommt es zur Verschiebung der Ladungen aus ihrer Gleichgewichtslage, das Molekül erhält ein Dipolmoment. Das Dipolmoment ruft nun in der Umgebung des Moleküls ein Feld hervor und induziert in einem anderen Molekül ein Dipolmoment. Die Phasen dieser sich schnell ändernden Dipolmomente stehen so in Beziehung, daß eine Anziehung erfolgt. Diese Anziehung ist nur sehr kurzreichweitig, sie läßt sich wie folgt abschätzen.

Die potentielle Energie U_{12} zwischen zwei wechselwirkenden Dipolen beträgt (Schpolski, 1973)

$$U_{12} = - \frac{2e^2}{r^3} x_1 x_2 \quad \begin{array}{l} r \cong \text{Abstand zwischen den Dipolen} \\ x_1 = \text{Auslenkung der Ladung 1} \end{array}$$

Die Frequenz der schwingenden, nicht gekoppelten Dipole ist

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{m}}$$

Durch die Anziehung kommt es zur Kopplung der schwingenden Dipole, die beiden Hauptfrequenzen ergeben sich dann zu

$$\omega_+ = \sqrt{\omega_0^2 - \frac{K}{m}} \quad \text{und} \quad \omega_- = \sqrt{\omega_0^2 + \frac{K}{m}}$$

$$\text{mit } \omega_0 = 2\pi \nu_0 \quad \text{und} \quad K_0 = \frac{2e^2}{r^3}$$

Die Energien dieser Oszillatoren sind gequantelt:

$$E_{n_+} = h\nu_+ (n_+ + \frac{1}{2}) \quad E_{n_-} = h\nu_- (n_- + \frac{1}{2})$$

die Gesamtenergie des Systems ergibt sich aus der Summe.

Eine Entwicklung liefert für die Frequenzen

$$\nu_+ = \nu_0 \left(1 - \frac{e^2}{r^3 k} - \frac{e^4}{2r^6 k^2} \right), \quad \nu_- = \nu_0 \left(1 + \frac{e^2}{r^3 k} - \frac{e^4}{2r^6 k^2} \right)$$

somit ist die Gesamtenergie

$$E = h\nu_0 \left(1 - \frac{e^4}{2r^6 k^2} \right),$$

$h\nu_0$ ist die Summe der Nullpunktsenergie beider Oszillatoren, die Größe der Kopplungsenergie beträgt dann

$$W_K = - \frac{e^4 h \nu_0}{2 k^2} \frac{1}{r^6} = - \frac{G}{r^6}$$

van der Waals Kräfte sind deshalb nur sehr kurzreichweitig.

Im Hämoglobin liegen die Abstände bei 0,4 nm (Shaanan, 1982).

1.2.3. Wasserstoffbrückenbindungen

Die Wasserstoffbrücke besteht zwischen einem Atom A, dem Donator, und einem Atom B, dem Akzeptor. An das Atom A ist der Wasserstoff gebunden, das Atom B ist stark elektronegativ und weist ein ungesättigtes Elektronenpaar auf. Ein typisches Beispiel sind die Wasserstoffbrücken in der α -Helix, der Donator ist der Stickstoff der Iminogruppe $\cdots \underset{\text{R}}{\text{C}} - \overset{\text{H}}{\text{N}} - \overset{\text{O}}{\text{C}} \cdots$ und der Akzeptor der Sauerstoff der Carbonylgruppe $\cdots \underset{\text{H}}{\text{N}} - \overset{\text{O}}{\text{C}} - \underset{\text{R}}{\text{C}} \cdots$ einer anderen Aminosäure.

Die Bindungslänge R (A ... B) ist weniger oder gleich der Summe der van der Waals Radien der Atome A und B (Vinogradov, Linell 1971). Die typische Bindungsenergie liegt bei 10-30 KJ/Mol.

1.2.4. Salzbrücken

Salzbrücken entstehen aufgrund der Coulombwechselwirkung zwischen einer positiv und einer negativ geladenen Gruppe. Ihre Bindungsenergie liegt zwischen 10-30 KJ/Mol in wässriger Lösung, kann sich aber durch ein Lösungsmittel mit kleiner Dielektrizitätskonstante wesentlich vergrößern.

1.2.5. Hydrophobe Wechselwirkungen

Neben den aufgeführten Bindungstypen kommt es auch durch die hydrophobe Wechselwirkung zu einer Stabilisierung des Hämoglobins. So liegt die Mehrzahl der hydrophilen Aminosäurereste auf der Außenseite des Hämoglobins, während die hydrophoben Aminosäurereste im Innern des Moleküls zueinander gerichtet sind. Der Energiebeitrag beruht auf einer Wechselwirkung zwischen Protein und Lösungsmittel. Die Änderung der freien Energie ist, wenn das Protein in Wasser gelöst wird, durch

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad \text{gegeben.}$$

ΔH , die Bindungsenergie, wird durch Wasserstoffbrücken zwischen Lösungsmittel und Protein bestimmt. Die Größe von ΔH hängt von der Polarität der Aminosäuren ab. Für nicht-polare Gruppen ist die Bindungsenergie sehr klein, da keine neuen Wasserstoffbrücken gebildet werden, bzw. alte zerstört werden.

Der weitaus größere Effekt wird durch die Änderung der Lösungs-entropie erzielt. Die Ausrichtung zweier hydrophober Aminosäuren zueinander führt zur Entropieverminderung, während die Entropie des umgebenden Wassers zunimmt (Volkenstein, 1983). Dieser Vorgang ist gleichbedeutend mit der Oberflächenverkleinerung gegenüber der Wasserphase bei der Verschmelzung zweier Öltröpfchen. Den größten Beitrag zur Stabilisierung der Tertiär- und Quartärstruktur liefert so die Entropieerhöhung des Wassers in der Umgebung der nicht-polaren Gruppen.

Die Summation aller schwachen Wechselwirkungen liefert die Stabilisierungsenergie für die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Hämoglobins. Änderungen in der Tertiär- und Quartärstruktur stellen somit auch die für die Sauerstoffbindung nötigen Energien zur Verfügung.

1.3.1. Sauerstoffbindung

Die Sauerstoffbindung im Hämoglobin erfolgt kooperativ. Jede Untereinheit im Hämoglobin ist in der Lage, jeweils ein Sauerstoffmolekül zu binden. Durch die Bindung eines O_2 -Moleküls an die prosthetische Gruppe einer dieser Untereinheiten erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für eine andere Untereinheit desselben Hb-Moleküls ebenfalls ein O_2 -Molekül zu binden. Der Sauerstoff wirkt also beim Hämoglobin als allosterischer Effektor, da er selbst einen Einfluß auf die Sauerstoffbindung hat.

Dieser Effekt erklärt auch die Sauerstoffbindungskurve, Abb.2, die im Gegensatz zum Myoglobin, einem monomeren Hämprotein, keinen hyperbolischen, sondern einen sigmoiden Verlauf zeigt.

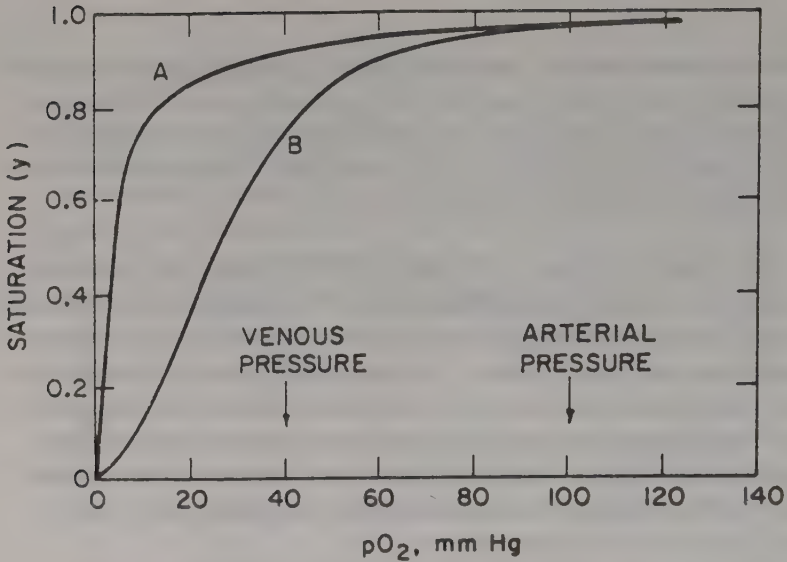


Abb. 2: Sauerstoffbindungskurve des Myoglobins(A) und des Hämoglobins(B) (Weissbluth 1974)

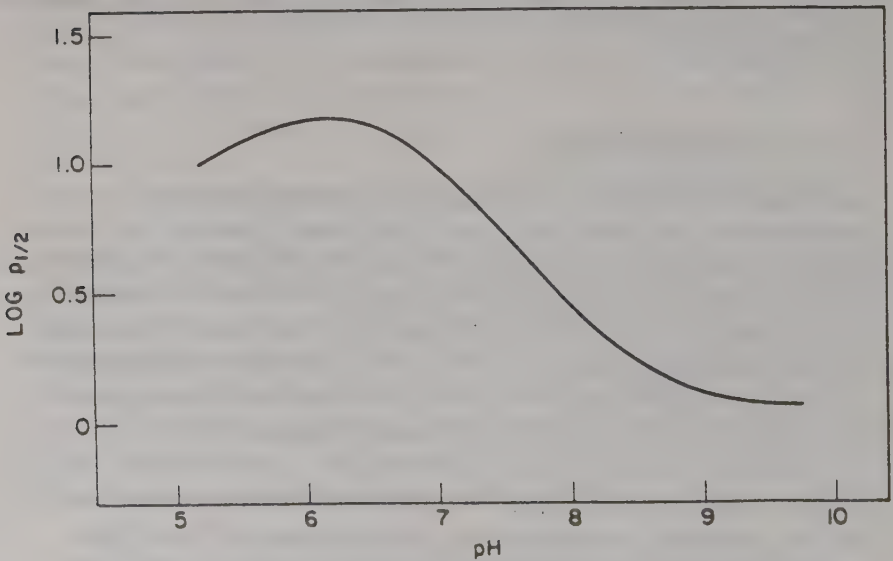
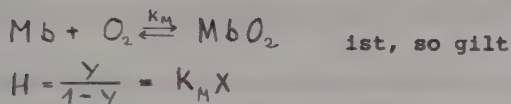


Abb. 3: Einfluss des pH-Wertes auf die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins (Weissbluth 1974)

Die Form der Kurven lässt sich durch die Hillgleichung beschreiben; wenn x gleich dem Sauerstoffpartialdruck pO_2 ist und K_M die Gleichgewichtskonstante der Reaktion



dabei gibt y den Anteil oxidierten Myoglobins am Gesamtmyoglobin an:

$$y = \frac{[MbO_2]}{[Mb] + [MbO_2]} = \frac{K_M [O_2]}{1 + K_M [O_2]}$$

Für Hämoglobin gilt die Hillgleichung in modifizierter Form

$$H = K x^n$$

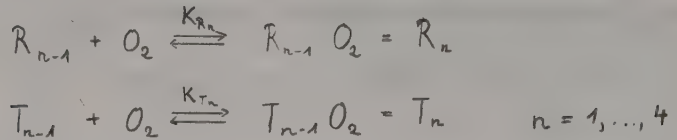
K und n sind Konstanten, die durch Anpassung des Experimentes an die Gleichung ermittelt werden. n , die Hill-Konstante, hat einen Wert zwischen 2.8 und 3. Kleine Hill-Konstanten weisen auf eine Abnahme der Kooperativität des Hämoglobins hin.

1.3.2. Kooperativität: Das Monod-Wyman-Changeux - Modell

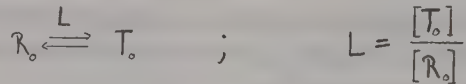
Das MWC-Modell (Monod, Wyman, Changeux (1965)) versucht eine thermodynamische Beschreibung der Kooperativität. Es wurde zunächst allgemein für allosterische Proteine entwickelt und geht von folgenden Voraussetzungen aus:

1. Es gibt keinen Unterschied zwischen α - und β -Untereinheiten.
2. Es gibt zwei Konformationen der Quartärstruktur: R (released) und T (tense).
3. Beide Konformationen sind in der Lage, 4 Sauerstoffmoleküle zu binden.
4. Die Untereinheiten im R- und T-Zustand besitzen eine unterschiedliche Sauerstoffaffinität.

5. In jeder Konformation gibt es eine Reihe von nacheinanderfolgenden Gleichgewichtszuständen:



6. Innerhalb eines Konformationszustandes ist die Bindung von Sauerstoff nicht kooperativ, d.h. die Wahrscheinlichkeit der Sauerstoffbindung ist unabhängig davon, ob andere Untereinheiten in demselben Molekül bereits oxygeniert sind. Deshalb können die Gleichgewichtskonstanten K_T , K_R in einzelnen mikroskopischen Konstanten k_r , k_t ausgedrückt werden.
7. Zwischen R- und T-Zustand gibt es ein Gleichgewicht



Mittels dieser Voraussetzungen kann der folgende Ausdruck für die Sauerstoffsättigungskurve angegeben werden (Weißbluth, 1974)

$$y = \frac{L c d (1 + c d)^3 + d (1 + d)^3}{L (1 + c d)^4 + d (1 + d)^4}$$

$$\text{mit } c = \frac{k_T}{k_R} \quad \text{und} \quad d = k_r \cdot X$$

Einen guten Fit der Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobins erhielt Monod et al. mit Werten für $L = 9000$ und $c = 0,014$, doch sind diese Werte nicht eindeutig, tatsächlich kann L zwischen 10^3 und 3×10^5 und c zwischen $0,04$ und $0,001$ variieren.

Deutlich wird, wie die Kooperativität in dieses Modell eingeht, wenn man die Variation der Parameter betrachtet. Ein hoher Wert für L bedeutet, daß sich Deoxyhämoglobin hauptsächlich im T-Zustand befindet, aber ein kleiner Wert von c impliziert gleichzeitig, daß die Sauerstoffaffinität des R-Zustandes groß ist.

In dem Moment aber, wo eine Untereinheit im R-Zustand oxygeniert wird, müssen mehr Untereinheiten vom T- in den R-Zustand übergehen, um L konstant zu halten. So werden wieder mehr R-Untereinheiten zur Sauerstoffaufnahme bereitgestellt.

Bis jetzt wurde die Form der Sauerstoffsättigungskurve beschrieben, aber noch keine Erklärung für die Verschiebung mit dem pH-Wert gegeben. Dieser Effekt soll im nächsten Kapitel beschrieben werden.

1.3.3. Bohreffekt

Die Anlagerung von Sauerstoff ist vom pH-Wert abhängig. Wie die Abb. 3 zeigt, steigt die Sauerstoffaffinität mit steigendem pH-Wert an. Da bei der Anlagerung eines O_2 -Moleküls etwa 0.6 Protonen frei werden (bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4) erfolgt die Ligandierung deshalb umso leichter, je weniger Protonen in der Lösung sind, was gleichbedeutend mit einem hohen pH-Wert ist. Diese Betrachtung gilt nur für den alkalischen Bohreffekt $pH > 6$.

Während die Ligandierung an der prosthetischen Gruppe erfolgt, liegt die Ursache für die Protonenabgabe beim Apoprotein. Die Abgabe eines Protons durch einen Aminosäurerest bei der Oxygenierung ist gleichbedeutend mit der Änderung ihres pK-Wertes. Für die betreffende Aminosäure gilt folglich:

$$pK_{\text{deoxy}} > pK_{\text{oxy}}$$

Ca. 25% des Bohreffektes werden vom Val NA2 (1) α verursacht, dessen pK-Wert bei der Oxygenierung durch den Bruch der Salzbrücke zu Arg HC3(141) α verändert wird. Dieser Schluß bleibt auch in umgekehrter Richtung gültig, denn bei der Verschiebung des pK-Wertes würde die Salzbrücke brechen. (Weißbluth, (1974)).

Als zweite Aminosäure wird von Perutz His HC3 (146) β vorgeschlagen. Seine Daten aus Röntgenkristall-Untersuchungen ergaben, daß die

Salzbrücke zwischen His NH^+ und Asp FG4 (94) β COO^- im Oxyhämoglobin nicht mehr vorhanden ist (Perutz 1970, Perutz und Ten Eyck 1972), dadurch verschiebt sich der pK-Wert des Histidins. Diese Verschiebung des pK-Wertes hat Kilmartin (1973) durch NMR-Messungen für His HC3 (146) β bestätigt. Er stellte fest, daß sich in 0,2 Mol/liter Phosphat- und 0,2 Mol/liter Chlorid-Lösung der pK-Wert bei der Ligandierung von 8,0 auf 7,1 verringert. Damit würde His HC3 (146) β ca. 50% zum Bohreffekt beitragen.

Demgegenüber stehen neuere Messungen von Russu et al. (1980, 1982) die zwar die alten Daten von Kilmartin bestätigen, aber die pK-Shift für phosphatfreie Lösungen mit niedriger Cl^- -Konzentration ($[\text{Cl}^-] < 0.06$ Mol/liter) nicht mehr feststellen. Sie erhielten eine pK-Shift von nur 0,13 pH, womit sich der Beitrag des His HC3 (146) β auf 5% reduzieren würde. Anschließende Messungen an allen Histidinen zeigten, daß ihr Gesamtbeitrag für den Bohreffekt bei niedriger Ionenstärke verantwortlich ist.

Neueste Arbeiten von Perutz et al. (1985) bezweifeln die Zuordnung der Histidine im NMR-Spektrum durch Russu et al. Sie sind der Meinung, daß die Linie, die Russu et al. His HC3 (146) β zuordnet zu His FG4 (97) β gehört. Die nun von ihnen His HC3 (146) β zugeordnete Linie führt zu einem pK-Wert von 6.2. Dieser pK-Wert bedeutet einen Bruch der Salzbrücke.

Der Bruch dieser Salzbrücke, His HC3 (146) β -Asp FG4 (94) β , ist aber essentiell für das folgende Modell, daß den Bohreffekt zusammen mit der Kooperativität erklärt.

1.3.4. Bohreffekt und Kooperativität, das stereochemische Modell von Perutz

Eine stereochemische Betrachtung der Kooperativität und des Bohreffektes im Hämoglobin lieferte Perutz (1970), indem er die Konformationsänderung des Moleküls vom Deoxy- zum Oxyhämoglobin beschrieb.

Im Deoxyhämoglobin liegt das Molekül im T-(tense) Zustand vor. Die beiden β -Ketten werden nur hier durch Di-Phosphoglycerat (DPG) zusammengehalten (Arnone, 1972). Alle vier Untereinheiten sind im t-Zustand. Der Übergang zur R-(released) Struktur erfolgt schrittweise, indem jede Untereinheit in den r-Zustand übergeht.

1. Zuerst wird in der α -Kette, da hier in der Hämtasche Platz vorhanden ist, Sauerstoff gebunden. Dabei bewegt sich das Eisenatom von einem Abstand $7,5 \times 10^{-11}$ m zu einem Abstand von 2×10^{-11} m zur Hämebene hin. Gleichzeitig verändert es dabei seinen Spin von $S = 2$ (high spin) zu $S = 0$ (low spin) und die Bindung zum proximalen Histidin wird leicht verkürzt. Unter der Berücksichtigung der sechzig van der Waals-Kontakte und der Porphyrin-Apo-protein-Kontakte ist dieser Vorgang, Veränderung der Position des Eisens und der relativen Lage des Histidins zum Porphyrin, ein sehr effektiver Trigger, um weitere Konformationsänderungen auszulösen.

2. Tyrosin HC2 (140) α sitzt im Deoxyhämoglobin zwischen der H- und der F-Helix. Durch die Oxygenierung bewegt sich die F-Helix auf die H-Helix zu, der Platz für das Tyrosin wird nun zu gering, so daß es nach außen gedreht wird. Gleichzeitig verändert sich dadurch die Position des terminalen Arginins HC3 (141) α_1 .

3. Das führt zum Bruch der Salzbrücken des Arginins zum Valin NA2 (1) α_2 und zum Aspartat H9 (126) α_2 . Gleichzeitig verringert sich der pK-Wert des terminalen Valins, ein Bohrproton wird abgegeben.

4. Durch den Bruch der erwähnten Salzbrücken befindet sich die α -Kette nun im r-Zustand. Die Gesamtstruktur ist $(\alpha^r, \alpha^r, \beta^t, \beta^t)$. Anschließend erfolgt die Oxygenierung der zweiten Kette und dann der Übergang von T nach R unter Abspaltung des DPG's.

Für die β -Ketten läuft der Vorgang ähnlich, aber nicht identisch ab.

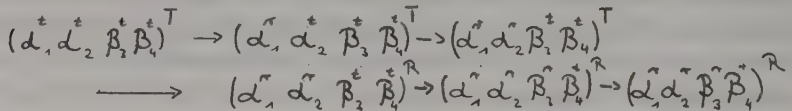
1. Um die Ligandierung zu ermöglichen, öffnet sich die Hämtasche, die dazu nötige Energie liefert das Gesamt-molekül. Der weitere Vorgang ist mit dem in der α -Kette identisch.

2. Durch eine Bewegung der F-Helix wird auch hier Tyrosin HC2 (145) β_1 aus seiner Tasche verdrängt. Das C-terminale Ende in der β -Kette wird aber von His HC3 (146) β_1 besetzt.

3. Die Salzbrücke von His HC3 (146) β_1 zum Asp FG1 (94) β_1 wird zerstört, der pK-Wert des Histidins sinkt ab, ein Bohrproton wird abgegeben.

4. Die β -Kette ist nun im r-Zustand.

Der Gesamttablauf sei schematisch noch einmal aufgezeigt:



Das Modell muß heute allerdings weiter verifiziert werden. So wird der Punkt 2 nicht erfüllt. Tyr HC2 (145) β bildet sowohl im Oxy- wie auch im Deoxyhämoglobin eine Wasserstoffbrücke zur CO-Gruppe des Val FG5 (98) β (Shaanan, 1983). Außerdem steht der Bruch der Salzbrücke His HC3 (146) β -Asp 94 (FG1) β , wie oben bereits erwähnt, zur Diskussion.

Was das Modell aber so interessant macht, ist die Verbindung von Bohreffekt und Kooperativität. Alles, was den Bohreffekt vermindert, verringert auch die Kooperativität und umgekehrt. So zeigt ein Molekül wie Myoglobin, dessen Sauerstoffbindungskurve hyperbolisch verläuft, keinerlei Bohreffekt. Eine Zahl von Experimenten (Weißbluth, 1974) belegt diese Theorie, dazu gehört die Modifizierung des Hämoglobins.

1.4.1. Modifizierte Hämoglobine

Um den Einfluß der Salzbrücke His HC3 (146) β -Asp FG1 (94) β genauer zu untersuchen, ist es möglich, das Hämoglobin zu modifizieren, indem man durch Zugabe eines geeigneten Stoffes die Ausbildung der Salzbrücke verhindert.

Ein solcher Stoff ist N-ethylmaleimid, das durch die Reaktion mit dem Schwefelwasserstoff des Cys FG (93) β zu N-ethylsuccinimid (NES) wird. Die sperrige NES-Gruppe verhindert dann die Ausbildung der Salzbrücke (Moffat, 1971), (Abb. 4). NES-Hämoglobin weist einen um 60% reduzierten Bohreffekt auf, die Hillkonstante liegt im physiologischen Bereich zwischen 2.4 und 2.1 (Kilmartin, Hewitt, 1971). Offen bleibt die Frage, ob die Reduzierung des Bohreffektes nur auf die Ausschaltung der Salzbrücke oder aber auf die sterische Veränderung des FG-Bereiches in der β -Kette zurückzuführen ist.

Ein anderes modifiziertes Hämoglobin, BME-Hb, ist weder kooperativ noch weist es einen Bohreffekt auf (Simon et al., 1967). BME (Bis-maleimido-methylether) bindet mit einem Ring an Cys FG (93) β und mit dem anderen an His FG4 (97) β (Abb. 5), so daß einmal die Ausbildung der Salzbrücke verhindert und zum anderen die Beweglichkeit des FG-Scharniers stark beeinträchtigt wird.

Experimente mit beiden modifizierten Hämoglobinen zeigen (Simon, 1966), daß der Bereich des FG-Scharniers wesentlich für den Bohreffekt und die Kooperativität des Moleküls ist. Der Einfluß des His HC3 (146) β läßt sich auch mit Hämoglobinen zeigen, bei denen das Histidin fehlt, des-His 146 β , oder durch eine andere Aminosäure ersetzt ist, z.B. Hb-Cowtown (His 146 $\rightarrow$ Leu) (Perutz et al.1984). Diese Hämoglobine weisen ebenfalls einen reduzierten Bohreffekt und verminderte Kooperativität auf. Doch ist es nicht eindeutig, ob das an der fehlenden Salzbrücke liegt. Denn durch den Einbau einer anderen Aminosäure als Histidin oder das Fehlen von Histidin wird die elektrostatische Umgebung der benachbarten Aminosäuren und damit deren Verhalten geändert.

1.4.2. Chlorid-Konzentration

Einen starken Einfluß auf die elektrostatische Umgebung der Aminosäure und damit auf den Bohreffekt hat auch die Chloridionen-Konzentration.

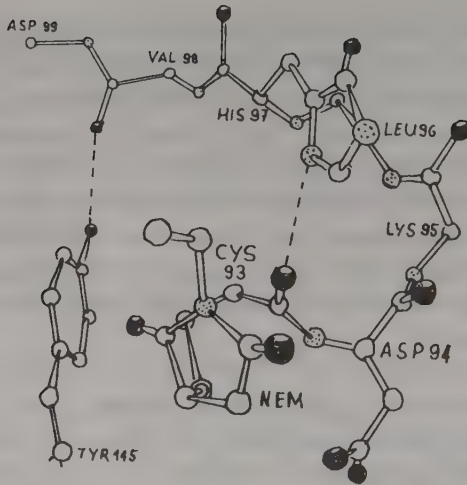


Abb. 4: NES-OxyHb im Bereich der F-FG-Helix

Kohlenstoffatome sind als leere, Stickstoffatome als gepunktete und Sauerstoffatome als volle Kreise gezeichnet, das Schwefelatom als doppelter Kreis. Alle Wasserstoffatome und die meisten Seitengruppen wurden nicht gezeichnet. (Simon et al, 1971)

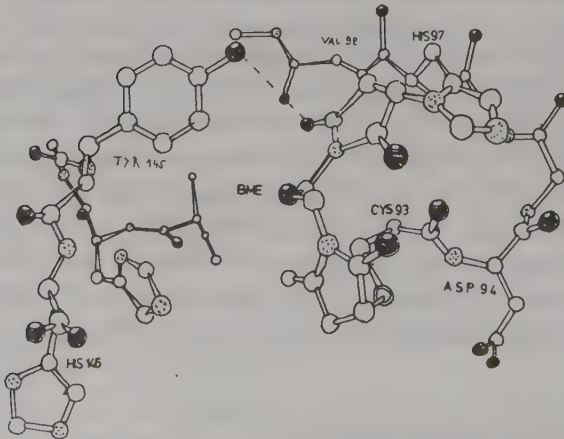


Abb. 5: BME-OxyHb im Bereich der F-FG-Helix

Die Kennzeichnung der Atome ist wie in Abb. 4

Rollema et al. (1975) zeigten, daß oberhalb einer KCl-Konzentration von 0.1 Mol/l der alkalische Bohreffekt mit steigender Cl^- -Konzentration abnimmt. Bei einer Cl^- -Konzentration von 0.1 Mol/l bis zu 5×10^{-3} Mol/l nimmt der alkalische Bohreffekt allerdings mit abnehmender Cl^- -Konzentration ab. Daß ein Maximum des Bohreffektes in der Nähe von einer 0.1 Mol/l-Lösung vorliegt, erscheint auch deshalb realistisch, weil dieser Wert in der Nähe des physiologischen Wertes von 0.15 Mol/l liegt.

Um den Einfluß von Chloridionen zu erklären, ging Rollema von folgenden Voraussetzungen aus:

1. Cl^- bindet sowohl an Hb als auch an HbO_2 .
2. Allerdings ist die Affinität zu Hb größer als zu HbO_2 .
3. Bei der Bindung des Chlorids an positiv geladene Gruppen vergrößern diese ihren pK-Wert.
4. Die Gruppen, welche Cl^- binden können, haben in Hb einen niedrigeren pK-Wert als die in HbO_2 .

Cl^- -Ionen binden an den Bindungsstellen des DPG. Da auch DPG die Sauerstoffaffinität absenkt (Benesch, Benesch 1968), ist der Einfluß von Cl^- und DPG auf die Funktion der betroffenen Aminosäuren ein ähnlicher.

Eine zweite wichtige Bindungsstelle ist zwischen Val NA2 (1) α und Ser H14 (131) α derselben Kette und Arg HC3 (141) α der anderen α -Kette (O'Donell 1979). Durch Carbamalyseierung des Val NA2 (1) α nimmt der Bohreffekt um 20-30% ab. Diese Differenz zu normalem Hämoglobin wird aber drastisch reduziert, geht man zu Chlorid-Konzentrationen unter 10 mMol/l. Außerdem sinkt der pK-Wert des Valins bei der Ligandierung von 7.8 auf 7.0, was dem normalen Wert des Valins entspräche. Damit ist auch die Forderung 3 von Rollema erfüllt, da bei der Ligandierung das Cl^- abgegeben wird. Es enthält keinen Widerspruch zur Forderung 4, da diese für chloridfreie Aminosäure gilt.

Eine mögliche weitere Bindungsstelle befindet sich in der Nähe von His HC3 (146) β und Asp FG1 (94) β (Norne 1978).

Bislang wurde die Funktion des Hämoglobins beschrieben. Besonders wurde dabei auf das Verhalten der Salzbrücke His HC3 (146)β -Asp FG1 (94)β und die Beweglichkeit des FG-Scharniers eingegangen.

Im folgenden Kapitel wird gezeigt, wie mit Hilfe des resonanten Ramaneffektes der Einfluß von Tertiärstrukturänderungen auf das Häm untersucht werden kann.

2. Resonanter Ramaneffekt

2.1. Klassische Beschreibung des Polarisierbarkeitstensors

Fällt Licht auf ein Molekül, so wird in diesem durch das elektrische Feld $\vec{E}$ ein Dipolmoment $\vec{P}$ erzeugt und es gilt

$$\vec{P} = \hat{\beta} \vec{E} \quad (1)$$

$\hat{\beta}$, der Polarisierbarkeitstensor, wird durch die elektronische Verteilung im Molekül bestimmt, die wiederum von den Kernkoordinaten Q abhängt.

Die Kerne führen um ihre Ruhelage die Normalschwingungen

$$Q_R(t) = Q_0 \cos 2\pi c \Omega_R t \quad \text{aus.} \quad (2)$$

Ω_R ist die Frequenz der R-ten Schwingung in Wellenzahlen, Q_R ihre Normalkoordinate. Entwickelt man bis zur 1. Ordnung um diese Normalkoordinate, so erhält man

$$\beta_{\sigma\sigma} = \beta_{\sigma\sigma} + \frac{\partial \beta_{\sigma\sigma}}{\partial Q_R} Q_R \cos(2\pi c \Omega_R t)$$

mit $\sigma\sigma = xyz$. Da für eine einfallende Lichtwelle der Frequenz

$$\tilde{\nu}_L \quad \vec{E} = \vec{E} \cos(2\pi \tilde{\nu}_L t) \quad \text{gilt,} \quad (3)$$

ergibt sich für das induzierte Dipolmoment

$$\begin{aligned} P_\sigma &= \sum \beta_{\sigma\sigma} \vec{E}_\sigma \cos(2\pi \tilde{\nu}_L t) \\ &+ \frac{1}{2} \frac{\partial \beta_{\sigma\sigma}}{\partial Q_R} Q_{R_0} \vec{E}_\sigma \cos(2\pi c (\tilde{\nu}_L - \tilde{\nu}_R) t) \\ &+ \frac{1}{2} \frac{\partial \beta_{\sigma\sigma}}{\partial Q_R} Q_{R_0} \vec{E}_\sigma \cos(2\pi c (\tilde{\nu}_L + \tilde{\nu}_R) t) \end{aligned} \quad (4)$$

Der erste Term in Glg. 4 beschreibt die Rayleighstreuung, der zweite und dritte Term die Ramanstreuung. Die Linien, deren Frequenz niedriger als die des eingestrahlichten Lichts ist, heißen Stokeslinien, die Linien mit höheren Energien heißen Antistokeslinien.

Zwischen Streuintensität und Polarisierbarkeit eines Moleküls gilt die Beziehung:

$$I_{\rho} = 4 \pi^2 c \tilde{\nu}_s^4 \left(\sum_{\sigma} \beta_{\sigma\sigma} E_{\sigma} \right)^2 \quad (5)$$

mit $\tilde{\nu}_s = \tilde{\nu}_L \pm \Omega_R$

Um die Ramanintensität einer Probe, in der die Moleküle statistisch verteilt sind, zu berechnen, müssen die Einzelintensitäten der Moleküle aufsummiert und eine Transformation in ein raumfestes Koordinatensystem vorgenommen werden. Bei der Mittelung über alle Raumorientierungen der Moleküle zerlegt man nach Plazcek (1934) den Polarisierbarkeitstensor in folgende Beiträge:

den isotropen Anteil

$$S_{\rho\sigma}^{\circ} := \frac{1}{3} (\beta_{xx} + \beta_{yy} + \beta_{zz}) \delta_{\rho\sigma} \quad (6a)$$

den anisotropen Anteil

$$S_{\rho\sigma}^s := \frac{1}{2} (\beta_{\rho\sigma} + \beta_{\sigma\rho}) - S_{\rho\sigma}^{\circ} \quad (6b)$$

und den antisymmetrischen Anteil

$$S_{\rho\sigma}^a := \frac{1}{2} (\beta_{\rho\sigma} - \beta_{\sigma\rho}) \quad (6c)$$

Damit werden die Tensorinvarianten definiert

$$\beta^s := S_P (\hat{S}^{\circ} \hat{S}^{\circ*}) \quad (7a)$$

$$\gamma := S_P (\hat{S}^s \hat{S}^{s*}) \quad (7b)$$

$$\beta := S_P (\hat{S}^a \hat{S}^{a*}) \quad (7c)$$

Die anschließende Mittelung ergibt die Intensität in Abhängigkeit der Tensorinvarianten.

Die Intensitäten sind, wenn das Licht in z-Richtung einfällt und der E-Vektor des einfallenden Lichts in x-Richtung liegt,

$$I_y = c \cdot I_0 \tilde{\gamma}_s^4 (3\gamma^2 + 5\beta^2) \quad (8a)$$

$$I_x = c \cdot I_0 \tilde{\gamma}_s^4 (4\gamma^2 + 10\beta^2) \quad (8b)$$

c = Konstante, I_0 ist die Intensität des eingestrahlichten Lichts

Mit Hilfe dieser beiden Größen läßt sich der Depolarisationsgrad S bestimmen. Dann gilt, wenn $I_{\perp}$ die senkrecht zur Streuebene (zy-Ebene) polarisierte Komponente des Lichts und $I_{\parallel}$ die dazu parallele ist

$$S = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}} = \frac{3\gamma^2 + 5\beta^2}{4\gamma^2 + 10\beta^2} \quad (9)$$

Strahlt man in der Nähe der Absorptionsbanden ein, kommt es zur Verstärkung der Ramanintensität. Dieser resonante Ramaneffekt kann mit der klassischen Formulierung des Ramantensors nicht mehr beschrieben werden.

2.2.1. Quantenmechanische Beschreibung des Polarisierbarkeits-tensors

Ein System Molekül-Strahlungsfeld läßt sich durch die zeitabhängige Schrödingergleichung

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \psi(t) = H \psi(t) \quad (10)$$

beschreiben.

In Born-Oppenheimer Näherung läßt sich der Hamiltonoperator nach Peticolas et al. (1970) folgendermaßen zerlegen:

$$H = H_{eq} + H_{eq} + H_R + H_{ER} + H_{EV} \quad (11)$$

dabei symbolisiert q die Elektronen und Q die Kernkoordinate.

H_{eq} ist der elektronische Hamiltonoperator für eine feste Koordinate Q_0 , H_{eq} steht für die Abhängigkeit der elektronischen Energie von der Kernkoordinate, H_R ist der Operator des Strahlungsfeldes.

H_{ER} ist der Elektron-Photon-Wechselwirkungsoperator

$$H_{ER} = i \left(\frac{2\pi\hbar}{V} \right)^{1/2} \sum_{k,\sigma} (c \cdot \vec{v}_k)^{1/2} [a_{\sigma k}^\dagger - a_{\sigma k}] \cdot R_{\sigma k} \quad (12)$$

Er beinhaltet den Dipoloperator $R_{\sigma k}$ (σ ist die Polarisation des k -ten Photons) und die Erzeugungs- und Vernichtungsoperatoren $a_{\sigma k}^\dagger$ und $a_{\sigma k}$.

H_{EV} ist der Elektron-Phonon-Operator

$$H_{EV} = \left(\frac{\hbar}{2\pi c \lambda_R} \right) \frac{\partial H}{\partial Q_R} (b_R^\dagger + b_R) \quad (13)$$

$b_R^\dagger$, b_R sind die Erzeugungs- und Vernichtungsoperatoren eines Phonons R . Sie stehen für Stokes- und Antistokes-Prozesse.

Loudon (1979) benutzte die zeitabhängige Störungstheorie, um die Übergangsrate für verschiedene Streuprozesse zu berechnen. In n -ter Ordnung erhielt er für die Übergangsrate:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{2\pi}{\hbar} \sum_f \langle f | H_I | i \rangle + \frac{1}{\hbar c} \sum_l \frac{\langle f | H_I | l \rangle \langle l | H_I | i \rangle}{(\tilde{\nu}_i - \tilde{\nu}_l)}$$

$$14) \quad + \frac{1}{(\hbar c)^{n-1}} \sum_{l_1} \dots \sum_{l_{n-1}} \frac{\langle f | H_I | l_1 \rangle \dots \langle l_{n-1} | H_I | i \rangle}{(\tilde{\nu}_i - \tilde{\nu}_{l_1}) (\tilde{\nu}_{l_1} - \tilde{\nu}_{l_2}) \dots (\tilde{\nu}_{l_{n-1}} - \tilde{\nu}_f)} \\ * \delta(\tilde{\nu}_i - \tilde{\nu}_f)$$

$|i\rangle$ und $|f\rangle$ sind die Anfangs- bzw. Endzustände, die $|l_n\rangle$ stehen für die Zwischenzustände.

$\frac{1}{2\pi c} \cdot \hbar \tilde{\nu}_i$ entspricht der Gesamtenergie der betreffenden Zustände.

H_I , der für den Streuprozess relevante Operator, setzt sich aus den oben beschriebenen Operatoren H_{ER} und H_{EV} zusammen.

Glg. 13 eingesetzt in Glg. 14 ergibt den Polarisierbarkeits-tensor $\hat{\beta}$ in 3. Ordnung (Peticolas et al. 1970) für den Stokes-prozess

$$\beta_{\sigma\sigma}^{(3)} = \left(\frac{\hbar}{2\pi c \lambda} \right)^{1/2} \left[\sum_{e,s} \frac{\langle g | R_e | e \rangle \langle e | \frac{\partial H}{\partial Q_s} | s \rangle \langle s | R_\sigma | g \rangle}{(\tilde{\nu}_e + \Omega_R - \tilde{\nu}_2 + i\gamma_e)(\tilde{\nu}_s - \tilde{\nu}_L + i\gamma_s)} \right. \\ 15) \quad \left. + \frac{\langle g | R_\sigma | e \rangle \langle e | \frac{\partial H}{\partial Q_s} | s \rangle \langle s | R_e | g \rangle}{(\tilde{\nu} - \Omega + \tilde{\nu} + i\gamma)(\tilde{\nu} + \tilde{\nu} + i\gamma_s)} \right]$$

Dabei sind $|g\rangle$ der Grundzustand
 $|e\rangle, |s\rangle$ angeregte elektronische Zustände.
 γ_e, γ_s sind die reziproken Lebensdauern
 der betreffenden Zustände

Der erste Term in Glg. 15 ist für den resonanten Ramaneffekt verantwortlich, er wird immer dann sehr groß, wenn die ein-ge-strahlte Energie in der Nähe von $\tilde{\nu}_e$ bzw. $\tilde{\nu}_s$ liegt ($0 \rightarrow 0$ Übergang) oder von $\tilde{\nu}_e + \Omega_R$ bzw. $\tilde{\nu}_e + \Omega_R$ ($0 \rightarrow 1$ Übergang).

Der Ablauf des Streuprozesses für diesen Term ist im folgenden Diagramm dargestellt.

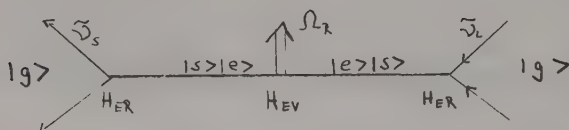


Abb. 6

Der Anfangszustand $|g\rangle$ ist rechts eingezeichnet.

Ein Photon mit der Frequenz $\tilde{\nu}_L$ wird eingestrahlt, wodurch ein Elektron vom Zustand $|g\rangle$ in den Zustand $|e\rangle$ angeregt wird. Durch Einwirken des Elektron-Phononoperators wird ein Phonon der Frequenz Ω_R erzeugt, danach befindet sich das Elektron im Zustand $|s\rangle$, von wo es unter Aussendung eines Photons mit der Frequenz $\tilde{\nu}_S$ wieder in den Grundzustand zurückkehrt.

Der zweite Term in Glg. 15 beschreibt den Prozeß in umgekehrter Zeitordnung, er trägt, wie sein Energienenner zeigt, nicht zum resonanten Ramaneffekt bei. Das Matrixelement $\langle e | \frac{\partial H}{\partial Q_R} | s \rangle$

in Glg. 15 beschreibt für $|e\rangle \neq |s\rangle$ die Herzberg-Tellerkopplung. Ist $|e\rangle = |s\rangle$ so handelt es sich bei $\langle e | \frac{\partial H}{\partial Q_R} | s \rangle$ um Franck-Condon Übergänge. Vernachlässigt wurde die Herzberg-Tellerkopplung zwischen Grundzustand $|g\rangle$ und angeregten elektronischen Zuständen $|e\rangle, |s\rangle$. Sie spielen in Porphyrinsystemen keine Rolle (Albrecht, 1960).

Bei der Anpassung der vorgestellten Theorie mit dem Experiment durch einen Computerfit traten imaginäre Fitkonstanten auf (Schweitzer (1983), Schweitzer-Stenner et al. (1984), el Naggar (1984). Da die elektronischen Wellenfunktionen reell sind, mußte eine Erklärung für diesen Widerspruch gefunden werden:

Um die vibronischen Seitenbanden im Oxyhämoglobin zu berücksichtigen (s. Kap. 2.3.1.) und die Maxima in der Mitte der Intensitätsprofile zu erhalten (s. Kap. 3), wurden in der Rechnung nicht

ramanaktive Moden zugelassen, die durch ein μ -tes Phonon repräsentiert werden. Diese sind aber in der Rechnung (Schweitzer, 1983) nicht zeitabhängig gerechnet worden. Wird dieses μ -te Phonon aber zeitabhängig behandelt, was zur Erweiterung des Ansatzes von Petricolas in 5. Ordnung führt, entfallen die imaginären Fitkonstanten. Die dazu nötige Theorie wird im nächsten Kapitel vorgestellt.

2.2.2. Erzeugung eines zweiten Phonons

Zur Erzeugung und Vernichtung eines zusätzlichen Phonons der Frequenz Ω_μ muß der Operator für die Elektron-Phonon-Wechselwirkung, H_{EV} , um die entsprechenden Operatoren $b_\mu, b_\mu^\dagger$ erweitert werden.

$$16) \quad H_{EV} = \left(\frac{\hbar}{2\pi\Omega_\lambda} \right)^{1/2} \frac{\partial H}{\partial Q_\lambda} b_\lambda^\dagger + \left(\frac{\hbar}{2\pi\Omega_\mu} \right)^{1/2} \frac{\partial H}{\partial Q_\mu} (b_\mu^\dagger + b_\mu)$$

Das Einsetzen von Glg. 16 in Glg. 14 liefert für den resonanten Anteil den Polarisierbarkeitstensor in 5. Ordnung.

$$17) \quad \beta_{\sigma\sigma}^{(5)} = \sum_{e,s} \sum_{\lambda,\mu} \frac{\hbar^{3/2}}{2\pi^2 \Omega_\lambda \Omega_\mu} \times$$

$$\left\{ M_\sigma^{90} \left[H_{es}^\lambda H_{se}^\mu H_{e\mu}^\lambda F_1(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_\lambda, \tilde{\nu}_\mu) \right. \right.$$

$$+ H_{es}^\mu H_{se}^\lambda H_{e\mu}^\mu F_2(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_\lambda, \tilde{\nu}_\mu)$$

$$\left. \left. + H_{es}^\mu H_{se}^\lambda H_{e\mu}^\lambda F_3(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_\lambda, \tilde{\nu}_\mu) \right] M_\sigma^{49} \right\}$$

mit

$$F_1(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_\lambda, \tilde{\nu}_\mu) = [(\tilde{\nu}_e + \Omega_\lambda - \tilde{\nu}_\mu + i\gamma_e)(\tilde{\nu}_s - \tilde{\nu}_\mu + i\gamma_s)(\tilde{\nu}_\lambda - \tilde{\nu}_\mu + i\gamma_\lambda)(\tilde{\nu}_\mu - \tilde{\nu}_\mu + i\gamma_\mu)]^{-1}$$

$$F_2(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_\lambda, \tilde{\nu}_\mu) = [(\tilde{\nu}_e + \Omega_\lambda - \tilde{\nu}_\mu + i\gamma_e)(\tilde{\nu}_s + \Omega_\lambda - \tilde{\nu}_\mu + i\gamma_s)(\tilde{\nu}_\lambda - \tilde{\nu}_\mu + i\gamma_\lambda)(\tilde{\nu}_\mu - \tilde{\nu}_\mu + i\gamma_\mu)]^{-1}$$

$$F_3(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_\lambda, \tilde{\nu}_\mu) = [(\tilde{\nu}_e + \Omega_\lambda - \tilde{\nu}_\mu + i\gamma_e)(\tilde{\nu}_s + \Omega_\lambda - \tilde{\nu}_\mu + i\gamma_s)(\tilde{\nu}_\lambda - \tilde{\nu}_\mu + i\gamma_\lambda)(\tilde{\nu}_\mu - \tilde{\nu}_\mu + i\gamma_\mu)]^{-1}$$

$\tilde{\nu}_i$ sind die Wellenzahlen für die elektronischen Übergänge vom Grundzustand $|g\rangle$ nach $|i\rangle$, γ^i sind die entsprechenden Halbwertsbreiten.

H_{es}^{μ} koppelt vibronisch über das μ -te Phonon die beiden elektronischen Zustände $|e\rangle$ und $|s\rangle$

$$H_{es}^{\mu} = \langle e | \frac{\partial H}{\partial q_{\mu}} | s \rangle \quad (19)$$

M_S^{ge} , M_S^{gu} ist das Dipolmoment zwischen den Grundzuständen und den angeregten Zuständen $|e\rangle$ und $|u\rangle$

$$M_S^{ge} = \langle e | R_p | g \rangle \quad (20)$$

Der durch den ersten Summanden in Glg. 15 beschriebene Streuprozess läuft wie folgt ab:

1. H_{ER} vernichtet ein Photon $\tilde{\nu}_L$ und hebt das System vom Grundzustand $|g\rangle$ in den angeregten Zustand $|e\rangle$.
2. Dort erzeugt H_{EV} ein Phonon Ω_R und versetzt das System in den Zustand $|s\rangle$.
3. H_{EV} erzeugt dann ein Phonon Ω_{μ} . Das System ist im Zustand $|t\rangle$.
4. Von wo es unter Vernichtung eines Phonons Ω_{μ} in den Zustand $|u\rangle$ übergeht.
5. Schließlich erzeugt H_{ER} ein Photon $\tilde{\nu}_i$ und das System kehrt in den Grundzustand $|g\rangle$ zurück.

Alle drei Summanden sind in der Abb. 7 dargestellt.

Die Beiträge, bei denen ein Photon im angeregten Zustand erzeugt und vernichtet würde, sind gleich Null, da der angeregte Zustand durch ein Phonon via H_{EV} erzeugt werden müßte, das ist aber aus Symmetriegründen nicht möglich.

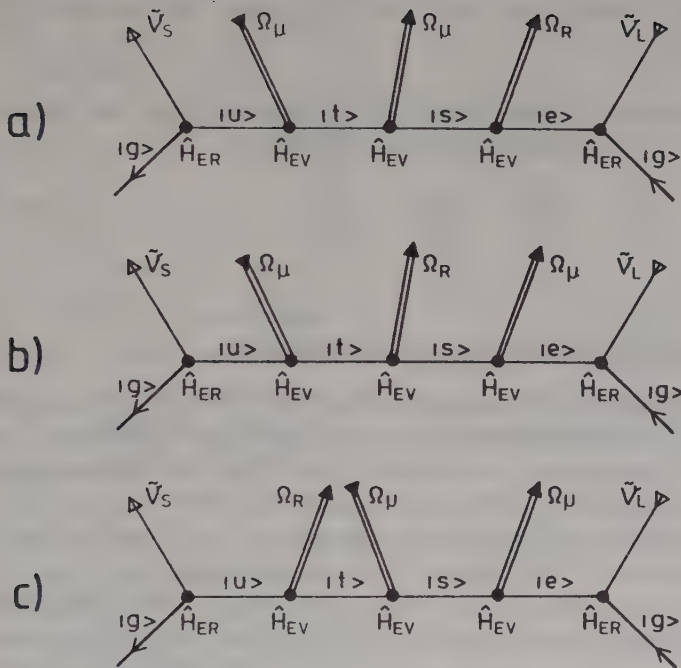


Abb. 7: Ramanstreuung in 5. Ordnung

Betrachtet man den Energienenner in Glg. 17, so erkennt man, daß es zur resonanten Verstärkung immer dann kommt, wenn das eingestrahlte Licht $\tilde{\nu}_L$ in der Nähe der Übergangsfrequenz der angeregten Zustände ist, bzw. um $\mathcal{N}_K$, $\mathcal{N}_\mu$ oder $\mathcal{N}_K + \mathcal{N}_\mu$ dazu verschoben ist.

Den vollständigen Polarisierbarkeitstensor erhält man aus der Summe des dritten und fünften Ordnungsterms

$$\hat{\beta} = \hat{\beta}^{(3)} + \hat{\beta}^{(5)} \quad (21)$$

2.3.1. Elektronische Zustände im Porphyrin

Zur Berechnung des Polarisierbarkeitstensors ist eine genauere Kenntnis der Elektronenstruktur des Porphyrins notwendig. Abb. 1 zeigt das Grundgerüst des Moleküls, es weist näherungsweise eine D_{4h} -Symmetrie auf. Da für das optische Spektrum nur das π -System wichtig und dieses antisymmetrisch ist, gibt es nur Molekülorbitale, die sich wie die Darstellungen A_{1u} , A_{2u} , B_{1u} , B_{2u} und E_g transformieren. Longuett-Higgins (1950) berechnete mit einem Hückel-LCAO-Verfahren die für die beiden optischen Übergänge $a_{2u} \rightarrow e_{gx,y}$ und $a_{1u} \rightarrow e_{gx,y}$ nötigen Energien mit 1.8 eV und 2.03 eV relativ gut (s. Abb. 8), konnte aber die unterschiedliche Intensität (Oszillatorenstärken) der Soret-Bande und der α -Bande nicht erklären. Außerdem versagt sein Modell für die in Oxyhämoglobin zusätzlich auftretenden β -Banden (Abb. 9).

2.3.2. Konfigurationswechselwirkung - Four Orbital Modell

Im Gegensatz zu Longuett-Higgins, der ein Einelektronensystem zu Grunde legte, benutzte Goutermann (1959) ein Zweielektronensystem. Bedenkt man, daß die beiden angeregten Zustände $a_{1u} \times e_{gx}$, e_u und $a_{2u} \times e_g = e_u$ von gleicher Symmetrie sind, kommt es über

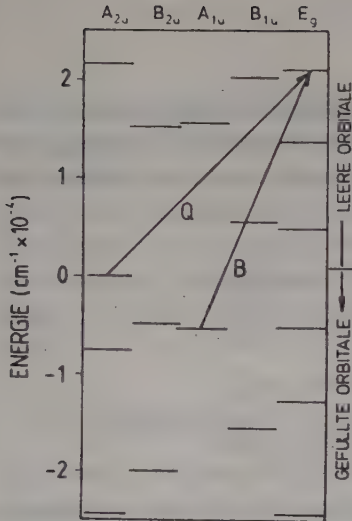


Abb. 8: Termschema der π -Elektronenniveaus von Porphin (Longuett-Higgins, 1950)

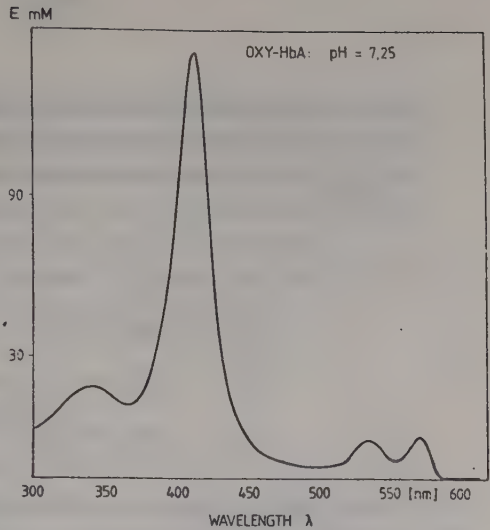


Abb. 9: Absorptionsspektrum des Oxyhämoglobins (Antonini, Brunori, 1971)

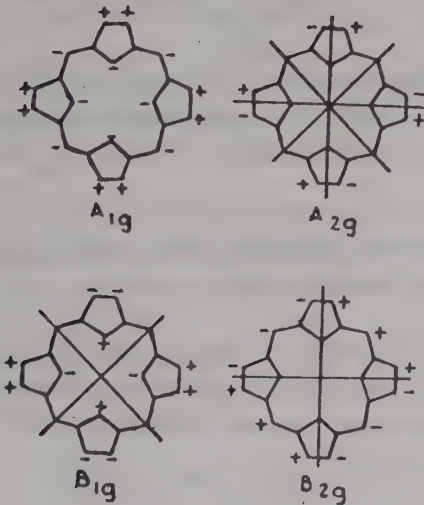


Abb. 10: Symmetriegruppen des Porphins (Gouterman, 1959)

Elektron-Elektron Abstoßung zur Konfigurations-Wechselwirkung (CI). Unter der Annahme, daß die Konfigurationen $(a_{1u}e_{gx})$ und $(a_{2u}e_{gx})$ dieselben Energien haben, erhält man die neuen elektronischen Zustände:

$$\begin{aligned} |a_x^0\rangle &= \frac{1}{\sqrt{2}} [|a_{2u}e_{gx}\rangle + |a_{1u}e_{gy}\rangle] \\ |a_y^0\rangle &= \frac{1}{\sqrt{2}} [|a_{2u}e_{gy}\rangle - |a_{1u}e_{gx}\rangle] \\ |B_x^0\rangle &= \frac{1}{\sqrt{2}} [|a_{2u}e_{gx}\rangle - |a_{1u}e_{gy}\rangle] \\ |B_y^0\rangle &= \frac{1}{\sqrt{2}} [|a_{2u}e_{gy}\rangle + |a_{1u}e_{gx}\rangle] \end{aligned} \quad (22)$$

Die Zustände heißen auch 50:50 States, da sie von gleichen Anteilen $|a_{1u}e_{gx}\rangle$, $|a_{2u}e_{gx}\rangle$ ausgehen.

Die entsprechenden Intensitäten lassen sich über die Dipolstärke berechnen, die sich ihrerseits aus dem Quadrat der Übergangsmomente R ergeben, sie sind

$$R^2 = \langle B_x^0 | e \vec{r} | g \rangle = \frac{1}{2} [R(a_{2u}e_{gx}) + R(a_{1u}e_{gx})]$$

und

$$r^2 = \langle a_x^0 | e \vec{r} | g \rangle = \frac{1}{2} [R(a_{2u}e_{gx}) - R(a_{1u}e_{gx})]$$

$R(a_{2u}e_{g\alpha})$ sind die Übergangsmomente für die Einelektronenzustände. Zu berücksichtigen ist dabei die Transformationseigenschaft der e_u -Zustände; bei einer Drehung um 90° geht e_{ux} in e_{uy} und e_{uy} in $-e_{ux}$ über.

Da $R(a_{2u}e_{g\alpha}) \approx R(a_{1u}e_{g\alpha})$, ist die Q-Bande eine verbotene Bande, wodurch ihre geringe Intensität erklärt wird.

Sind die Energien der $(a_{1u}e_\alpha)$ und $(a_{2u}e_\alpha)$ Konfiguration nicht gleich, so führt dies zu neuen Zuständen, die durch einen Entmischungsparameter ν charakterisiert werden, für ihn gilt

$$\nu = \frac{1}{2} \arctan \left[\frac{1}{2\Delta} (E(a_{2u}e_{gp}) - E(a_{1u}e_{g\alpha})) \right]$$

wobei

$$\Delta = 2 \langle a_{1u}e_{g\alpha} | C \bar{I} | a_{2u}e_{gp} \rangle \quad \text{ist.}$$

Die im Oxyhämoglobin auftretende β -Bande ist eine vibronische Seitenbande der $Q(0,0)$ und α -Bande. Sie wird durch die gleichzeitige Anregung zusätzlicher vibronischer Zustände erzeugt und ist deshalb, weil mehrere vibronische Zustände angeregt werden können, auch breiter als die $Q(0,0)$ -Bande. Ihre Bezeichnung lautet auch $Q(0,1)$ -Bande. Der Abstand zur $Q(0,0)$ Bande ist für alle Porphyrine nahezu konstant 1200 cm^{-1} .

2.4.1. Ramanstreuung in Hämoglobin

Aus dem vorherigen Kapitel wird ersichtlich, daß zwischen 450 und 530 nm nur die Q- und die B-Bande zum Ramaneffekt beitragen. Statt über $|e\rangle$ und $|s\rangle$ in Glg. 17 wird jetzt nur über $|Q\rangle$ und $|B\rangle$ summiert.

Da sich $\frac{\partial H}{\partial Q_k}$ transformiert wie die Normalkoordinaten der Schwingung Q, können in D_{4h} -Symmetrie nur solche Schwingungen ramanaktiv sein, die sich wie $E_u \times E_u = A_{1g}, B_{1g}, A_{2g}$ und B_{2g} verhalten. Berechnet man für die verschiedenen Symmetrien den Depolarisationsgrad, so erhält man

	$\Gamma = A_{1g}$	$\rho = \frac{1}{4}$	polarisiert
24)	$\Gamma = B_{1g}, B_{2g}$	$\rho = \frac{3}{4}$	depolarisiert
	$\Gamma = A_{2g}$	$\rho = \infty$	invers depolarisiert

Im allgemeinen kann man so durch die Messung von ρ auf die Symmetrie einer Ramanschwingung zurückschließen. Allerdings sind die gemessenen Werte des Depolarisationsgrades im Hämoglobin nicht exakt $1/4$, $3/4$ bzw. ∞ und zeigen vor allem im präresonanten Bereich eine starke Variation mit der Frequenz des einfallenden Lichts. Das führt zur Erweiterung der bisher vorliegenden Theorie.

Die neuen "rotierten" Zustände lassen sich damit durch die 50:50 States ausdrücken, sie sind

$$\begin{aligned} |Q'_x\rangle &= \cos \nu |Q_x^\circ\rangle - \sin \nu |B_x^\circ\rangle \\ |Q'_y\rangle &= \cos \nu |Q_y^\circ\rangle - \sin \nu |B_y^\circ\rangle \\ |B'_x\rangle &= \cos \nu |B_x^\circ\rangle + \sin \nu |Q_x^\circ\rangle \\ |B'_y\rangle &= \cos \nu |B_y^\circ\rangle + \sin \nu |Q_y^\circ\rangle \end{aligned} \quad (25)$$

Die entsprechenden Übergangsmomente sind dann

$$26) \quad R' = \left[\frac{1}{2}(1 + \cos 2\nu) R^{\circ^2} + R^{\circ} r^{\circ} \sin 2\nu + \frac{1}{2}(1 - \cos 2\nu) r^{\circ^2} \right]^{1/2}$$

und

$$27) \quad r' = \left[\frac{1}{2}(1 - \cos 2\nu) R^{\circ^2} - R^{\circ} r^{\circ} \sin 2\nu + \frac{1}{2}(1 + \cos 2\nu) r^{\circ^2} \right]^{1/2}$$

Dadurch gewinnt die Q-Bande an Intensität und verliert ihren verbotenen Charakter.

Eine weitere Mischung der $|B\rangle$ und $|Q\rangle$ Orbitale ergibt sich aus Störungen der reinen D_{4h} -Symmetrie im Porphyrin, durch Substitution an den Seitenketten des Porphyrins (Goutermann 1959), oder durch vibronische Kopplung (Herzberg-Teller-Effekt).

Diese Störungen müssen sich wie $E_u \times E_u$ verhalten, können also nur A_{1g} , B_{1g} , A_{2g} oder B_{2g} Symmetrie aufweisen.

Der für die Wechselwirkung notwendige Störoperator H_{per} soll im folgenden auf Ein-Elektron-Probleme beschränkt bleiben. Die Ein-Elektron-Symmetrien, die zwischen $|Q\rangle$ und $|B\rangle$ Zuständen koppeln, sind in Tabelle I aufgeführt (O'Rourke 1983).

Diese führen schließlich zu neuen elektronischen Basisfunktionen $|Q_{\pm}\rangle$ und $|B_{\pm}\rangle$ und ihren Energien, die in Tabelle II aufgeführt sind.

Tabelle 1 : Die zwischen $|Q\rangle$ und $|B\rangle$ koppelnden
Ein-Elektron-Symmetrien nach O'Rourke (1983)

	Q'_x	Q'_y	B'_x	B'_y
Q'_x	$a'_{1g} - \frac{-\sin 2\nu b_{2g}}{\sin 2\nu (a_{1g} + b_{1g})}$	$-\sin 2\nu b_{2g}$	$\cos 2\nu (a_{1g} + b_{1g})$	$-a_{2g} + \cos 2\nu b_{2g}$
Q'_y		$a'_{1g} - \frac{\sin 2\nu (a_{1g} - b_{1g})}{\sin 2\nu (a_{1g} - b_{1g})}$	$a_{2g} + \cos 2\nu b_{2g}$	$\cos 2\nu (a_{1g} - b_{1g})$
B'_x			$a'_{1g} + \frac{\sin 2\nu b_{2g}}{\sin 2\nu (a_{1g} + b_{1g})}$	$\sin 2\nu b_{2g}$
B'_y				$a'_{1g} + \frac{\sin 2\nu (a_{1g} - b_{1g})}{\sin 2\nu (a_{1g} - b_{1g})}$

$$a_{1g} = \langle Q_x | H_{EV} | B_x \rangle = \langle Q_y | H_{EV} | B_y \rangle$$

$$a'_{1g} = \langle Q_x | H_{EV} | B_x \rangle = \langle B_x | H_{EV} | B_x \rangle$$

$$b_{1g} = \langle Q_x | H_{EV} | B_x \rangle = -\langle Q_y | H_{EV} | B_y \rangle$$

$$b_{2g} = \langle Q_x | H_{EV} | B_y \rangle = \langle Q_y | H_{EV} | B_x \rangle$$

$$a_{2g} = \langle Q_y | H_{EV} | B_x \rangle = -\langle Q_x | H_{EV} | B_y \rangle$$

Tabelle 2 : Elektronische Basisfunktionen

$$|Q_{\pm}(s)\rangle = |Q'_{\pm}\rangle + |B'_{\pm}\rangle \frac{\cos 2\nu (a_{1g} \mp c_1 b_{1g} \mp c_2 b_{2g})}{E'_Q - E'_B} + |B_{\mp}\rangle \frac{\mp a_{2g}}{E'_Q - E'_B}$$

$$|B_{\pm}(s)\rangle = |B'_{\pm}\rangle + |Q'_{\pm}\rangle \frac{\cos 2\nu (a_{1g} \mp c_1 b_{1g} \mp c_2 b_{2g})}{E_B - E_Q} + |Q'_{\mp}\rangle \frac{\mp a_{2g}}{E'_B - E'_Q}$$

$$E_{Q\pm} = E'_Q + a_{1g} - \sin 2\nu (a_{1g} \mp c_1 b_{1g} \mp c_2 b_{2g}) + \frac{(\cos 2\nu) (a_{1g} + b_{1g} + b_{2g}) + a_{2g}}{E'_Q - E'_B}$$

$$E_{B\pm} = E'_B + a_{1g} + \sin 2\nu (a_{1g} \mp c_1 b_{1g} \mp c_2 b_{2g}) + \frac{(\cos 2\nu) (a_{1g} + b_{1g} + b_{2g}) + a_{2g}}{E'_Q - E'_B}$$

$$c_1 = 1 - \frac{b_{2g}^2}{b_{1g}^2 + b_{2g}^2 + b_{1g} (b_{1g}^2 + b_{2g}^2)^{1/2}}, \quad c_2 = \frac{b_{2g}}{2b_{1g}}$$

2.4.2. Symmetrieklassifizierte Verzerrungen in der Hämgruppe

Unter der Annahme, daß das Molekül um eine Verzerrung von der idealen D_{4h} -Symmetrie abweicht, kann jede Symmetrieklasse von δQ^{Γ_i} dieser Darstellung durch eine Überlagerung der Normalkoordinaten $a_i \cdot \delta Q_i^{\Gamma_j}$ (a_i sind Normierungskoeffizienten)

$$(28) \quad \delta Q = \sum_{i,j} a_i \delta Q_i^{\Gamma_j} \quad \text{dargestellt werden.}$$

(Die a_i werden in den folgenden Rechnungen nicht mehr berücksichtigt.)

Das führt zur Veränderung der Matrixelemente H_{es}^{Λ} und H_{es}^{μ} in Glg. 17 für das gestörte Molekül. Die vibronischen Kopplungsoperatoren $\frac{\partial H}{\partial Q_i^{\Gamma_j}}$ und $\frac{\partial H}{\partial Q_{\mu}^{\Gamma_j}}$ werden in Bezug auf die Verzerrung δQ^{Γ_j} in eine Taylorreihe entwickelt.

Damit ergeben sich die folgenden Ausdrücke

$$\frac{\partial H}{\partial Q_i^{\Gamma_j}} = \left. \frac{\partial H}{\partial Q_i^{\Gamma_j}} \right|_{\delta Q^{\Gamma_j}=0} + \sum_{\Gamma_j} \left(\frac{\partial^2 H}{\partial Q_i^{\Gamma_j} \partial Q^{\Gamma_j}} \right)_{\delta Q^{\Gamma_j}=0} \delta Q^{\Gamma_j}$$

und

(29)

$$\frac{\partial H}{\partial Q_{\mu}^{\Gamma_j}} = \left. \frac{\partial H}{\partial Q_{\mu}^{\Gamma_j}} \right| + \sum_{\Gamma_j} \left(\frac{\partial^2 H}{\partial Q_{\mu}^{\Gamma_j} \partial Q^{\Gamma_j}} \right)_{\delta Q^{\Gamma_j}=0} \delta Q^{\Gamma_j}$$

wobei $\sum_{\Gamma_j}$ über alle Raman-erlaubten irreduziblen Darstellungen der D_{4h} -Gruppe summiert.

In Glg. 21 eingesetzt erhält man den Polarisierbarkeitstensor, Glg. 30.

Die vibronischen Kopplungsmatrizen $\mathcal{D}_{es}^R$, $\mathcal{D}_{es}^{\mu}$ und $\mathcal{D}_{es}^{\mu}$ können wegen der in E_u nicht erlaubten z-polarisierten Dipolmomente in 2×2 Tensoren (McClain, 1971) beschrieben werden.

Wegen der Zeitabhängigkeit der durch sie beschriebenen Prozesse kommutieren sie nicht miteinander, deshalb muß die Reihenfolge

der unterschiedlichen 5-Ordnungs-Prozesse berücksichtigt werden. Das führt dazu, daß jeder Term der Summe in Glg. 29 einzeln berechnet werden muß.

$$\begin{aligned}
 \beta = & \sum_{\substack{e,s \\ a,b}} \left[\left(\frac{\hbar}{2\pi c \Lambda_R} \right)^{1/2} M_s^{ge} \eta_{es}^R M_\sigma^{sg} F(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s) \right. \\
 & + \sum_{e,s} \sum_{\substack{t,u \\ a,b}} \left\{ \frac{\hbar^{3/2}}{(2\pi c)^{3/2} \Lambda_R^{1/2} \Lambda_\mu} \cdot M_s^{ge} \cdot \right. \\
 & \left. \left(\eta_{es}^R \eta_{st}^\mu \eta_{tu}^\mu F_1(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_t, \tilde{\nu}_u) \right. \right. \\
 & + \eta_{es}^\mu \eta_{st}^R \eta_{tu}^\mu F_2(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_t, \tilde{\nu}_u) \\
 & \left. \left. + \eta_{es}^\mu \eta_{st}^\mu \eta_{tu}^R F_3(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s, \tilde{\nu}_t, \tilde{\nu}_u) \right) \cdot M_\sigma^{sg} \right\}
 \end{aligned} \quad (30)$$

$$\text{mit } F(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s) := [(\tilde{\nu}_e + \Lambda_R - \tilde{\nu}_s + i\gamma_e)(\tilde{\nu}_s - \tilde{\nu}_e + i\gamma_s)]^{-1}$$

$$\text{und } \eta_{es}^R := \langle e | \frac{\partial H}{\partial Q^R} \Big|_{\delta Q^R=0} + \sum_{\Gamma^J} \frac{\partial^2 H}{\partial Q^R \partial Q^{\Gamma^J}} \Big|_{\delta Q^{\Gamma^J}=0} \cdot \delta Q^{\Gamma^J} | s \rangle$$

$$\eta_{es}^\mu := \langle e | \frac{\partial H}{\partial Q^{\Gamma^\mu}} \Big|_{\delta Q^{\Gamma^\mu}=0} + \sum_{\Gamma^J} \frac{\partial^2 H}{\partial Q^{\Gamma^\mu} \partial Q^{\Gamma^J}} \Big|_{\delta Q^{\Gamma^J}=0} \cdot \delta Q^{\Gamma^J} | s \rangle$$

2.4.3. Berechnung des vollständigen Polarisierbarkeitsensors

Die Matricelemente η_{es}^R , η_{es}^μ können durch die McClain-Tensoren in Bezug auf die Raman-erlaubten Darstellungen A_{1g} , B_{1g} , A_{2g} und B_{2g} ausgedrückt werden

$$\begin{aligned}\eta_{es}^R &= c_{es}^{A_{1g}, R} \hat{T}^{A_{1g}} + c_{es}^{B_{1g}, R} \hat{T}^{B_{1g}} + c_{es}^{B_{2g}, R} \hat{T}^{B_{2g}} + c_{es}^{A_{2g}, R} \hat{T}^{A_{2g}} \\ \eta_{es}^\mu &= c_{es}^{A_{1g}, \mu} \hat{T}^{A_{1g}} + c_{es}^{B_{1g}, \mu} \hat{T}^{B_{1g}} + c_{es}^{B_{2g}, \mu} \hat{T}^{B_{2g}} + c_{es}^{A_{2g}, \mu} \hat{T}^{A_{2g}}\end{aligned}\quad (31)$$

$$\begin{aligned}\text{mit } \hat{T}^{A_{1g}} &= \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} & \hat{T}^{B_{1g}} &= \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix} \\ \hat{T}^{B_{2g}} &= \begin{pmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix} & \hat{T}^{A_{2g}} &= \begin{pmatrix} 0 & -1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix}\end{aligned}\quad (32)$$

Die $c_{es}^{\Gamma, R}$, $c_{es}^{\Gamma, \mu}$ ergeben sich dann zu

$$\begin{aligned}c_{es}^{\Gamma, R} &= \langle e | \frac{\partial H}{\partial Q^R} + \frac{\partial^2 H}{\partial Q^R \partial Q^{A_{1g}}} \delta Q^{A_{1g}} | s \rangle \quad (\Gamma = R) \\ c_{es}^{\Gamma, R} &= \langle e | \frac{\partial^2 H}{\partial Q^R \partial Q^{B_{1g}}} \delta Q^{B_{1g}} | s \rangle \quad (\Gamma = R \times B_{1g}) \\ c_{es}^{\Gamma, R} &= \langle e | \frac{\partial H}{\partial Q^R} + \frac{\partial^2 H}{\partial Q^R \partial Q^{A_{2g}}} \delta Q^{A_{2g}} | s \rangle \quad (\Gamma = R) \\ c &= \langle e | \frac{\partial^2 H}{\partial Q^\mu \partial Q^{B_{2g}}} \delta Q^{B_{2g}} | s \rangle \quad (\Gamma = \mu \times B_{2g})\end{aligned}\quad (33)$$

Das führt zum endgültigen Ausdruck für den Polarisierbarkeits-tensor

$$\begin{aligned}\hat{\beta} &= \sum_{es} \left(\frac{\kappa}{2\pi c \mathcal{L}_R} \right)^{1/2} M_S^{ge} \left(\sum_{\Gamma} c_{es}^{\Gamma, R} \hat{T}^{\Gamma} \right) F_{es}(\tilde{\nu}_e, \tilde{\nu}_s) M_S^{sg} \\ &+ \sum_{es} \sum_{\mu} \left(\frac{\kappa}{2\pi c \mathcal{L}_R \mathcal{L}_\mu} \right)^{3/2} M_S^{ge} \\ &\times \left(\sum_{\Gamma} c_{es}^{\Gamma, R} \hat{T}^{\Gamma} \right) \left(\sum_{\Gamma'} c_{st}^{\Gamma'} \hat{T}^{\Gamma'} \right) \left(\sum_{\Gamma''} c_{tu}^{\Gamma''} \hat{T}^{\Gamma''} \right) \cdot F_1 \\ &\times \left(\sum_{\Gamma} c_{es}^{\Gamma, \mu} \hat{T}^{\Gamma} \right) \left(\sum_{\Gamma'} c_{st}^{\Gamma'} \hat{T}^{\Gamma'} \right) \left(\sum_{\Gamma''} c_{tu}^{\Gamma''} \hat{T}^{\Gamma''} \right) \cdot F_2 \\ &\times \left(\sum_{\Gamma} c_{es}^{\Gamma, R} \hat{T}^{\Gamma} \right) \left(\sum_{\Gamma'} c_{st}^{\Gamma'} \hat{T}^{\Gamma'} \right) \left(\sum_{\Gamma''} c_{tu}^{\Gamma''} \hat{T}^{\Gamma''} \right) \cdot F_3 \cdot M_S^{\mu g}\end{aligned}\quad (34)$$

Die C_{es}^{μ} , C_{es}^{κ} werden in einem Fitprogramm als Parameter eingesetzt, so daß simultan die Dispersionskurve des Depolarisationsgrades und die Anregungsprofile gefittet werden.

Da die C_{es}^{μ} linear von den statischen Verzerrungen δQ^{μ} (Glg. 33) abhängen, erlaubt ihre Größe und Variation schließlich Rückschlüsse auf die statischen Verzerrungen im Hämmolekül.

2.4.4. Statische Verzerrungen in der Hämgruppe

Im Protoporphyrin IX wird die D_{4h} -Symmetrie des Porphyrins durch die Vinyl- und Methylgruppen und durch die Propionsäuren gestört. Störungen an den äußeren Seitengruppen des Porphyrins führen nach Gouterman (1959) zu A_{1g} , B_{1g} , A_{2g} und B_{2g} Verzerrungen. Wenn man sich zusätzlich in Abb. 10 die vier Symmetriegruppen ansieht, wird deutlich, daß sich Störungen an den Methinbrücken wie A_{1g} und B_{2g} nicht aber wie A_{2g} und B_{1g} transformieren.

Schwieriger ist der Einfluß der Störungen abzuschätzen, die über das zentrale Eisenatom in das Porphyrinsystem einkoppeln. Bewegt sich das Eisenatom senkrecht zur Porphyrinebene, so stört es den inneren Porphyrinring, der dadurch seine Größe verändert. Das würde sich besonders an den Stickstoffen und Methinbrücken bemerkbar machen und damit A_{1g} , B_{1g} und B_{2g} Störungen aber keine A_{2g} Störung hervorrufen.

3. Berechnung unterschiedlicher Titrationszustände

Ziel der Arbeit ist die Variation der Dispersionskurve des Depolarisationsgrades und die der Intensitätsprofile mit dem pH-Wert zu interpretieren und damit die Biophysik des Hämoglobins weiter zu klären. Wurde im vorigen Kapitel der Zusammenhang zwischen Dispersion und den Verzerrungen der Hämgruppe aufgezeigt, so geht es in diesem Kapitel um den Einfluß von pH-Werten auf die aufgenommenen Meßkurven.

Die bislang vorliegende Theorie behandelte nur einen Konformationstyp des Hämoglobins. Tatsächlich liegen aber wegen der verschiedenen Protonierungen verschiedene Konformationstypen des Hämoglobins in der Lösung vor. Diese unterschiedlichen Konformationen, die zu unterschiedlichen Verzerrungen der Hämgruppe führen, besitzen aber auch dann folgerichtig jeweils eigene Polarisierbarkeitstensoren. Durch Überlagerung dieser Polarisierbarkeitstensoren $\hat{\beta}_i$ zu einem effektiven Polarisierbarkeitstensor $\hat{\beta}_{eff}$ kann auf die für die Konformation des Hämoglobins wichtigen pK-Werte (s. 1.2.4.) geschlossen werden (Schweitzer-Stenner et al., 1985a).

Jeder Titrationszustand S_1 wird für einen gegebenen pH-Wert durch seine Besetzungszahl v_i charakterisiert. v ist dabei entweder 0 oder 1, 0 steht für eine deprotonierte und 1 für eine protonierte Aminosäure der Gruppe i . So ergibt sich $\hat{\beta}_{eff}$ als Superposition der Tensoren $\hat{\beta}_i$, die zu den jeweiligen S_1 gehören

$$\hat{\beta}_{eff} = \left[\sum_i \frac{n_i}{N} (\beta_i)^2 \right]^{1/2} \quad (35)$$

N bestimmt die Gesamtzahl der Moleküle. n_1 , die Zahl der Moleküle im Zustand S_1 , kann über das Massenwirkungsgesetz als Funktion $n_1(K_1, \dots, K_1, pH)$ berechnet werden, dabei ist K_1 die jeweilige Massenwirkungskonstante der i -ten Gruppe.

Wie der Polarisierbarkeitstensor $\hat{\beta}_{eff}$ spiegeln die Fitkonstanten $C_{es}^{\Gamma_R}$, $C_{es}^{\Gamma_\mu}$ effektive Beiträge zu diesem Streutensor wider, die aus inkohärenten Superpositionen der Ramanintensitäten der jeweiligen Molekültypen resultieren.

So gilt

$$C_{\mu}^{\Gamma_R} = \left[\sum_l \frac{n_l}{N} \left\{ (\eta_{es,l}^{\Gamma_R} \delta q_l^{\Gamma_\mu})^2 + 2(\eta_{es,l}^{\Gamma_R} \delta q_l^{\Gamma_\mu} \varepsilon_{es}^{\Gamma_R}) + (\varepsilon_{es}^{\Gamma_R})^2 \right\} \right]^{1/2} \quad (\Gamma = \Gamma_j \times \Gamma_R = \Gamma_R)$$

$$C_{\mu}^{\Gamma_R} = \left[\sum_l \frac{n_l}{N} (\eta_{es,l}^{\Gamma_R} \delta q_l^{\Gamma_\mu})^2 \right]^{1/2} \quad (36) \quad (\Gamma = \Gamma_j \times \Gamma_R \neq \Gamma_R)$$

mit $\eta_{es,l}^{\Gamma_R} = \langle s | \frac{\partial^2 H}{\partial q_{\Gamma_\mu}^2 \partial q_{\Gamma_R}} | e \rangle$

und $\varepsilon_{es}^{\Gamma_R} = \langle s | \frac{\partial H}{\partial q_{\Gamma_R}} | e \rangle$

Eine ähnliche Beziehung kann für die Fitkonstanten des μ -ten Phonons entwickelt werden.

Zur Vereinfachung werden die Fitparameter einer Darstellung summiert, die daraus folgenden Ausdrücke sind:

$$\sum_{A_{45}}^R = \sum_{\substack{\Gamma_S \\ = Q_B}} |C_{es}^{A_{45}, \Gamma_A}| \quad (37)$$

$$\sum_B^R = \frac{1}{2} \sum_{\Gamma_S} (|C_{es}^{B_{45}, \Gamma_A}| + |C_{es}^{B_{29}, \Gamma_A}|)$$

Ausgehend von drei titrierbaren Gruppen, die die Ramanstreuung beeinflussen, wurde folgendes Diagramm entwickelt.

(s. Abb. 11)

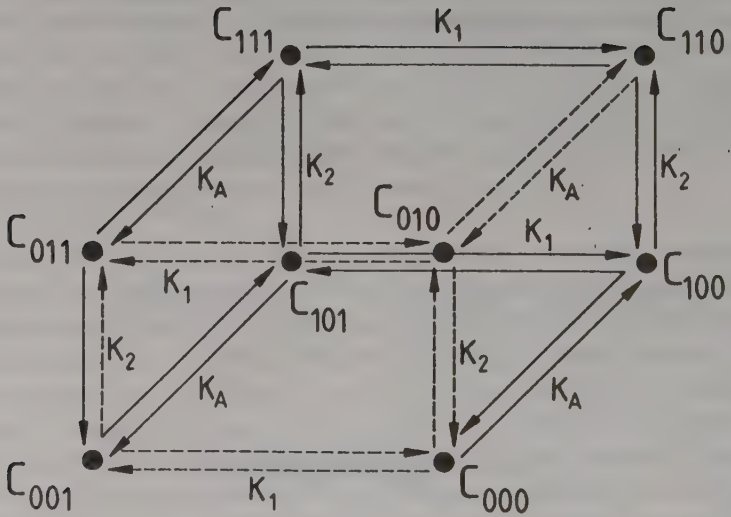


Abb. 11: Chemisches Gleichgewicht zwischen den unterschiedlichen Protonierungszuständen C_{ijk} . $i, j, k = 0$, wenn die dazugehörige Gruppe deprotoniert oder 1 wenn sie protoniert ist. Die Gleichgewichtszustände sind mit K_1 , K_2 und K_A gekennzeichnet.

Die c_{ijk} beschreiben die unterschiedlichen Titrationszustände des Moleküls, wobei die Indizes i, j, k für die drei titrierbaren Gruppen stehen ($i, j, k = 1$ oder 0 , s.o.). Die Anordnung der i, j, k erfolgt mit steigenden pK -Werten, das dazugehörige Massenwirkungsgesetz lautet:

$$\frac{n_{i,j=1,k} [H^+]}{n_{i,j=0,k}} = k_j \quad (38)$$

Die Gleichgewichtskonstanten k_1 und k_2 beschreiben die Protonierung im physiologischen Bereich, K_A ist die entsprechende Konstante für den sauren Bereich.

Die Besetzungszahlen n_{ijk} der Zustände c_{ijk} können dann durch die folgenden Ausdrücke berechnet werden:

$$\frac{n_{000}}{N} = \left[1 + \frac{[H^+]}{K_2} + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{[H^+]}{K_A} + \frac{[H^+]^2}{K_1 K_2} + \frac{[H^+]^2}{K_1 K_A} + \frac{[H^+]^2}{K_2 K_A} + \frac{[H^+]^3}{K_1 K_2 K_A} \right]^{-1}$$

$$\frac{n_{001}}{N} = \left[1 + \frac{K_2}{[H^+]} + \frac{K_1}{K_2} + \frac{K_1}{K_A} + \frac{[H^+]}{K_A} + \frac{[H^+]}{K_A} + \frac{[H^+]^2}{K_2 K_A} + \frac{[H^+] K_1}{K_2 K_A} \right]^{-1}$$

$$\frac{n_{010}}{N} = \left[1 + \frac{K_2}{[H^+]} + \frac{K_2}{K_1} + \frac{K_2}{K_A} + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{[H^+]}{K_A} + \frac{[H^+]^2}{K_1 K_A} + \frac{[H^+] K_2}{K_1 K_A} \right]^{-1}$$

$$\frac{n_{100}}{N} = \left[1 + \frac{K_A}{[H^+]} + \frac{K_A}{K_1} + \frac{K_A}{K_2} + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{[H^+]}{K_2} + \frac{[H^+]}{K_1 K_2} + \frac{[H^+] K_A}{K_1 K_2} \right]^{-1}$$

$$\frac{n_{011}}{N} = \left[1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_2}{[H^+]} + \frac{K_1}{K_A} + \frac{K_2}{K_A} + \frac{K_1 K_2}{[H^+] K_A} + \frac{K_1 K_2}{[H^+]^2} + \frac{[H^+]}{K_A} \right]^{-1}$$

$$\frac{n_{110}}{N} = \left[1 + \frac{K_2}{[H^+]} + \frac{K_A}{[H^+]} + \frac{K_2}{K_1} + \frac{K_A}{K_1} + \frac{K_2 K_A}{[H^+] K_2} + \frac{K_2 K_A}{[H^+]^2} + \frac{[H^+]}{K_1} \right]^{-1}$$

$$\frac{n_{101}}{N} = \left[1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_A}{[H^+]} + \frac{K_1}{K_2} + \frac{K_A}{K_2} + \frac{K_1 K_A}{K_2 [H^+]} + \frac{K_1 K_A}{[H^+]^2} + \frac{[H^+]}{K_2} \right]^{-1}$$

$$\frac{n_{111}}{N} = \left[1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_2}{[H^+]} + \frac{K_A}{[H^+]} + \frac{K_1 K_2}{[H^+]^2} + \frac{K_1 K_A}{[H^+]^2} + \frac{K_2 K_A}{[H^+]^2} + \frac{K_1 K_2 K_A}{[H^+]^3} \right]^{-1}$$

(39)

Durch das Einsetzen von Glg. 36 und Glg. 39 in Glg. 37 ist es nun möglich, die pH-Abhängigkeit der Ramantensor-Parameter $\sum_{A_1}^R$ und $\sum_B^R$ zu fitten. Die pK-Werte pK_1 , pK_2 und pK_3 sowie die Werte des Tensorparameters $\sum_r^R c_{ijk}$ ($r=A_2, B$) der verschiedenen Titrationszustände c_{ijk} dienen als Fitparameter.

Die so gewonnenen pK-Werte gehören zu Aminosäuren, deren Protonierung wesentlichen Einfluß auf die Hämgruppe besitzen. Nicht relevante Aminosäuren des Proteins werden durch unsere Meßmethode nicht erfaßt.

4. Experiment und Ergebnisse

4.1. Präparative Methode

Das Hämoglobin wird aus den Erythrocyten des menschlichen Bluts gewonnen. Um Erythrocyten zu erhalten, wird das Blut mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, dann wird die Gesamtlösung zentrifugiert und schließlich die über den Erythrocyten stehende Kochsalzlösung mit dem Blutplasma dekantiert. Danach werden die Erythrocyten mit destilliertem Wasser hämolysiert. Um die Hämoglobinlösung von den Zellwänden der Erythrocyten zu trennen, wird das Hämolysat für 1 h bei 20.000 U/min zentrifugiert.

Die gewonnene Hämoglobinlösung wird zur weiteren Behandlung auf die Konzentration von 1 mMol/l (monomer) eingestellt. Zur Einstellung eines pH-Wertes wird das Hämoglobin in einen Dialyseschlauch gefüllt und dann in einer Pufferlösung mit dem gewünschten pH-Wert dialysiert.

Der Puffer bestand für den Bereich zwischen den pH-Werten 7,5 und 9 aus einer 0,1 Mol/l tris-Lösung und im Bereich unter pH 7,5 aus einer 0,1 Mol/l bis-tris-Lösung.

Die endgültige Messung des pH-Wertes erfolgte nach Beendigung einer Raman-Meßreihe, damit die Temperatur für die pH-Bestimmung und die Raman-Messung identisch blieb. So wird die Abhängigkeit des pH-Wertes von der Temperatur für die oben genannten Puffer berücksichtigt.

Die unterschiedlichen Chloridkonzentrationen ergeben sich aus den Chloridkonzentrationen der Pufferlösungen. Für die Messungen von Schweitzer (1983) und Schweitzer-Stenner et al. (1984b) wurde eine 0,4 Mol/l Pufferlösung benutzt. Da die Einstellung des pH-Wertes der Puffer durch unterschiedliche Mengen von Salzsäure erfolgt, ergibt sich für die entsprechenden pH-Werte folgende Chloridkonzentration

Tris Puffer 0.4 M 0.1 M Tabelle 3
pH-Wert (25°C) Chlorid-Konzentration (Mol/liter)

9,5	0.03	0.008
9,0	0.08	0.020
8,5	0.15	0.039
8,0	0.23	0.057
7,5	0.27	0.067

Bis-Tris Puffer

7,0	0.13	0.03
6,5	0.20	0.05
6,0	0.25	0.06
5,5	0.27	0.07

Die Werte ergeben sich aus der Menge der zugeführten Salzsäure, sie wurden durch eine anschließende Titration mit Silbernitrat überprüft.

Um die Chloridkonzentration zwischen 0.3 und 0.5 Mol/l Cl^- zu erhalten, wurden 400 ml einer 0,4 Mol/l Pufferlösung 4,7 g NaCl zugefügt. Um eine Lösung mit einer konstanten Chlorid-Lösung von 1 Mol/liter zu erhalten, wurde zu der Pufferlösung eine jeweils entsprechende Menge von NaCl hinzugefügt.

Die Modifizierung der Moleküle mit BME bzw. NEM erfolgte jeweils vor der Dialyse. BME (NEM) wurde im Verhältnis 1 Teil BME (NEM) zu 2 Teilen Hämoglobin (monomer) der Oxyhämoglobinlösung beigefügt. Vor der anschließenden Dialyse verbleibt die Lösung für 24 h bei 6°C, wobei sie zwischenzeitlich zwei- bis dreimal leicht geschüttelt wird.

Bei der BME-Oxyhämoglobinlösung wurde nach 14 Tagen eine deutliche Bildung von Methämoglobin sichtbar. Ein ähnlicher Vorgang bei NES-Oxyhämoglobin konnte nicht beobachtet werden. BME wurde freundlicherweise von Prof. H. Fasold, Frankfurt, zur Verfügung gestellt. NEM ist ein Produkt der Firma Sigma.

Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration erfolgte durch die Aufnahme des optischen Spektrums. Dabei wurde ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{544}^H = 13.8$ für die α -Bande und $\epsilon_{577}^H = 14.6$ für die β -Bande zugrunde gelegt (Antonini und Brunori, 1971).

4.2. Meßapparatur

Als Lichtquelle diente ein Argon-Ionen-Laser. Es standen neun Laserlinien mit unterschiedlicher Intensität zwischen 457.9 nm und 528.7 nm zur Verfügung. Der senkrecht zur Streuebene polarisierte Laserstrahl wurde mit einer Zylinderlinse auf die Probe fokussiert. Die Hämoglobinlösung befand sich in einer 1 cm-Quarzküvette, die ihrerseits in einem Kupferblock steckte, der auf 6° C gekühlt wurde. Das gestreute Licht wurde von einem Kondensor ($f = 75$ mm) auf den Eintrittsspalt eines Czery-Turner Doppelmonochromators abgebildet. Der Winkel zwischen eingestrahlttem Licht und Beobachtungsrichtung betrug ca. 135°. Zwischen Polarisationsanalysator und Eintrittsspalt befand sich ein Polarisationssscrambler, um die unterschiedliche Transmission des Spektrometers für verschieden polarisiertes Licht auszu-schalten.

Abb. 12 zeigt den experimentellen Aufbau.

Die von einem Photomultiplier aufgenommenen Signale wurden von einem Photoncountingsystem bearbeitet und auf einen x-t-Schreiber gegeben. Die so gewonnenen Spektren wurden anschließend mit einem Programm zur Linienformanalyse ausgewertet. Die Linienformanalyse wurde notwendig, um die Peakhöhe I_0 der 1375 cm^{-1} - und 1638 cm^{-1} -Linien zu bestimmen. Dabei treten zwei Probleme auf.

1. Die Form der durch Fluoreszenz bestimmten Baseline
2. Überlagerung durch andere Linien.

Die gemessenen Spektren setzen sich folgendermaßen zusammen:

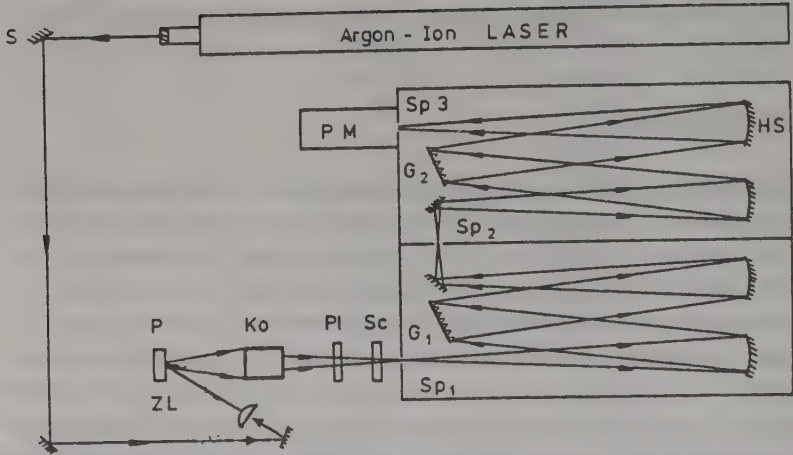


Abb. 12: Experimenteller Aufbau zur Aufnahme der Ramanspektren

S : Ulenkspiegel

HS: Hohlspiegel

ZL: Zylinderlinse

Sc: Polarisations-Scrambler

G : Monochromator-Gitter

P : Probe

Ko: Linsensystem (Kollimator)

Pl: Polarisator

Sp: Spalt

PM: Photomultiplier

$$I(x) = \text{Baseline} + \sum_i I_o^i \frac{\gamma^2}{(x_o^i - x)^2 + \gamma^2}$$

x_o ist die Lage der i-ten Linie mit der Peakhöhe I_o , γ ihre Linienbreite.

Dem Rechner wird eine Baseline vorgegeben. Dann wird von allen beobachteten Linien die Lage x_o^i und die geschätzte Höhe I_o^i sowie die gemessene Höhe $I(x_o^i)$ eingegeben. Der Rechner errechnet dann durch Anpassung die gewünschte wahre Peakhöhe I_o^i aller Linien und simuliert mit diesen Größen das aufgenommene Spektrum. Ein anschließender Vergleich mit dem gemessenen Spektrum, insbesondere der Höhe der Minima - die Höhe der Maxima ist immer korrekt - dient der Kontrolle der vorgegebenen Baseline.

Die so erhaltenen Ramanintensitäten wurden mit den Transmissionskurven des Analysators und des Spektrometers korrigiert. Zur Ermittlung der Transmissionskurven wurden die Ramanintensitäten eines Quarzkristalls gemessen, da diese nur eine ω^4 -Abhängigkeit von der Frequenz des eingestrahltten Lichts besitzen.

Da die Ramanintensität proportional zu $\tilde{\nu}_L (\tilde{\nu}_L + \tilde{\nu}_R)^3$ ist, wird die erhaltene Ramanintensität durch diesen Faktor dividiert. Die angegebenen Intensitäten sind alle auf eine Laserleistung von 1 Watt und eine Hämoglobinkonzentration von 0.8 mMol/liter (monomer) bezogen.

Eine weitere mögliche Korrektur ist der Einfluß der Öffnung des Kondensors auf den Depolarisationsgrad. Für $\varnothing \gg 1$ wird $I_{||}$ (parallel zur Streuebene) zu klein gemessen und für $\varnothing < 0.1$ wird $I_{\perp}$ zu klein gemessen. Eine Korrektur ist für einen Depolarisationsgrad zwischen 0.13 und 0.8 aber nicht nötig, weil der hierbei auftretende Fehler unter 2% ist (Deb 1984) und somit unterhalb der Meßgenauigkeit liegt.

Auch die Korrektur durch die Absorptionsdispersion der Probe kann bei einer abgebildeten Probendicke von $30\text{ }\mu\text{m}$ und einer Konzentration von 1 mMol/l entfallen (el Naggar, 1984).

4.3. Fitprogramm

Der Computerfit der Depolarisationsgrade und der Anregungsprofile wurde mit einem Minimierungsprogramm (Minuitl) der CERN-Programmbibliothek durchgeführt. Es verwendet drei unterschiedliche Minimierungsprogramme, um die lokalen Minima der korrespondierenden χ^2 -Funktion zu suchen. Eine ausführliche Beschreibung dieses Programms findet sich bei Schweitzer (1983).

4.4. Ramanspektren des Oxyhämoglobins

Die Ramanspektren des Oxyhämoglobins zwischen 1250 und 1700 cm^{-1} für die Anregungswellenlängen $\lambda = 457,9\text{ nm}$ im präresonanten Bereich der Soretbande und $\lambda = 528,5\text{ nm}$ im präresonanten Bereich der α -Bande sind in Abb. 13 und Abb. 14 gezeigt.

Für die späteren Rechnungen wurden die Linie bei 1375 cm^{-1} (Oxidationsmarker) und die Linie bei 1638 cm^{-1} (Spin oder Core-Sizemarker) (Asher, 1981) ausgewertet.

Die beiden Linien zeigen ein unterschiedliches Verhalten bei den beiden Anregungsfrequenzen. Der Oxidationsmarker wird stärker angeregt, wenn in der Nähe der Soret-Bande eingestrahlt wird, während im Bereich der α -Bande die Verstärkung für den Spinmarker größer wird.

Die zu den beiden Linien gehörenden Normalschwingungen wurden für das Nickeloctaethylporphyrin von Abe (1978) ermittelt, sie sind in Abb. 15 dargestellt. Die Normalschwingungen des Oxidationsmarkers transformieren sich wie A_{1g} , die des Spinmarkers wie B_{1g} in D_{4h} .

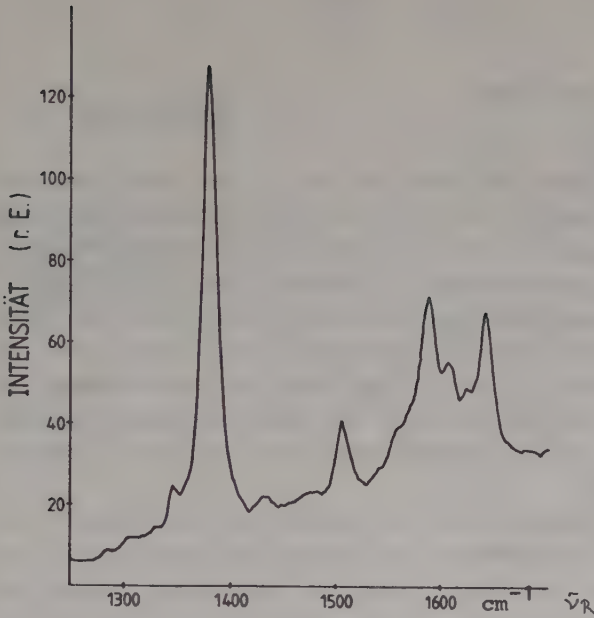


Abb. 13: Ramanspektrum des Oxyhämoglobins bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_L = 457,9 \text{ nm}$

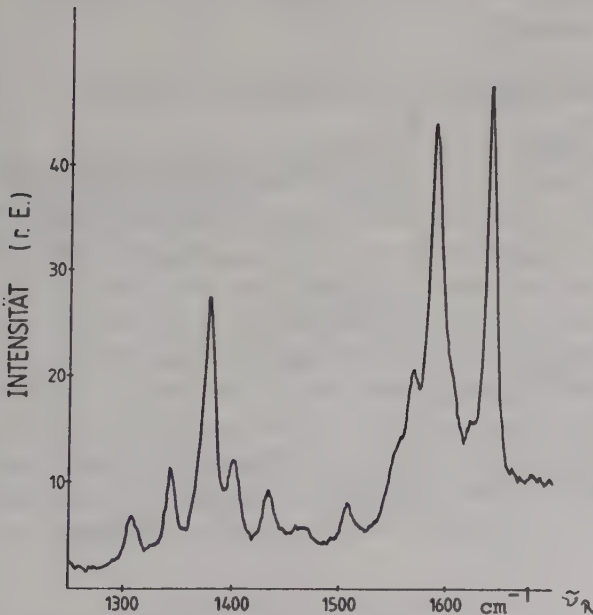


Abb. 14: Ramanspektrum des Oxyhämoglobins bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_L = 528,5 \text{ nm}$

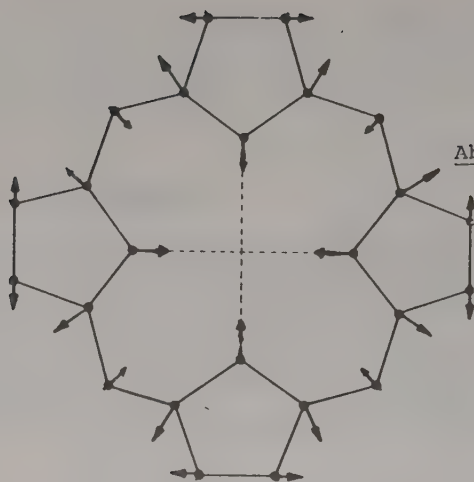


Abb. 15a: Normalmoden nach
Abe (1978) für
Ni-octaethylporphyrin
 $A_{1g} \quad \tilde{\nu}_R = 1383 (1375) \text{ cm}^{-1}$

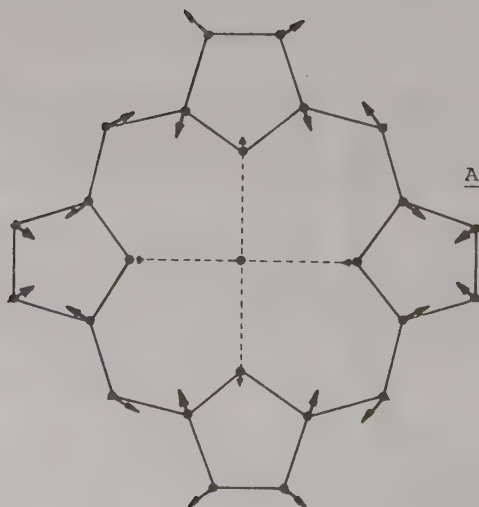


Abb. 15b: Normalmoden nach
Abe (1978) für
Ni-octaethylporphyrin
 $A_{1g} \quad \tilde{\nu}_R = 1655 (1638) \text{ cm}^{-1}$

4.5. Meßprogramm

Um etwas über den Einfluß der Chloridkonzentration auf die Funktion des Hämoglobins zu erfahren, wurden die Dispersionskurve des Depolarisationsgrades und die Anregungsprofile in Abhängigkeit vom pH-Wert für Chloridkonzentrationen zwischen 0.08 und 1 Mol/liter gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen und ihre anschließende Auswertung mit dem Fitprogramm werden in diesem Abschnitt vorgestellt. Ihre Interpretation gibt dann weiteren Aufschluß über die Änderung der pK-Werte der für die Hämoglobinfunktion wichtigen Aminosäuren.

Außerdem werden die Ergebnisse von Messungen zweier modifizierter Hämoglobine aufgezeigt, die keinen bzw. einen reduzierten Bohreffekt aufweisen. Im Falle von BME-HbO₂ wird so der Zusammenhang zwischen festgestellten pH-Variationen im Oxyhämoglobin und dem Bohreffekt deutlich. Die Messungen von NES-HbO₂ schließlich dienen der Untersuchung der Rolle der FG-Helix unter spezieller Berücksichtigung des His FG1(97)β .

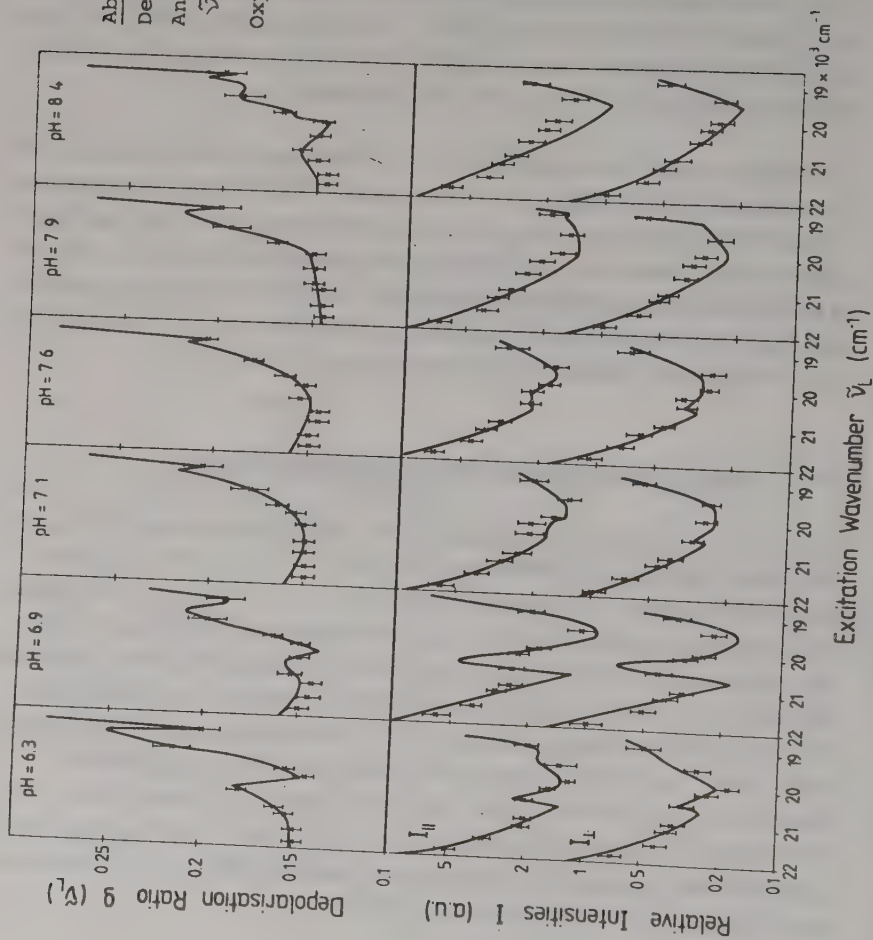
4.6. Depolarisationsgrad und Anregungsprofile

Abb. 16 a, b zeigt den Verlauf des Depolarisationsgrades und der Anregungsprofile für die 1375 cm⁻¹-Linie sowie für die 1638 cm⁻¹-Linie im Bereich zwischen pH 6.3 und pH 8.4 für eine Oxyhämoglobinlösung im 0.1 Mol/l Puffer. Es ist in Abb. 16a der für die 1375 cm⁻¹-Linie typische Anstieg des Depolarisationsgrades über $\vartheta = 0.2$ im Bereich der α -Bande festzustellen. Die Depolarisationsgrade und auch die Anregungsprofile zeigen für pH 7.1 und pH 7.9 eine Verringerung der Variation der Dispersion im Vergleich zu den Messungen von Schweitzer (1983) bei einer Cl⁻-Konzentration zwischen 0.1-0.3 Mol/l. Die Dispersion des Depolarisationsgrades für die 1638 cm⁻¹-Linie zeigt deutliche Variationen mit dem pH-Wert.

Abb. 16a:

Depolarisationsgrad und
Anregungsprofile für
 $\bar{\nu}_R = 1375 \text{ cm}^{-1}$

OxyHb, $[\text{Cl}^-] < 0.08 \text{ Mol/l}$



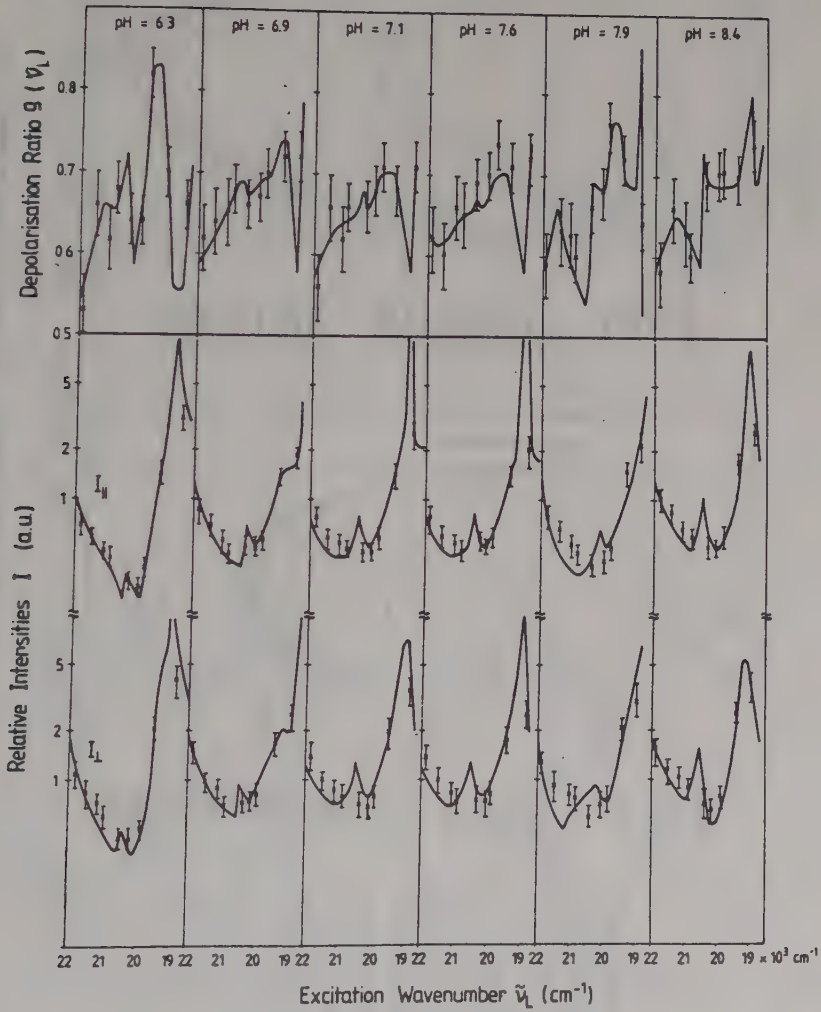


Abb. 16b: Depolarisationsgrad und Anregungsprofile
für $\tilde{\nu}_L = 1638 \text{ cm}^{-1}$, OxyHb, $[\text{Cl}^-] < 0.08 \text{ Mol/l}$

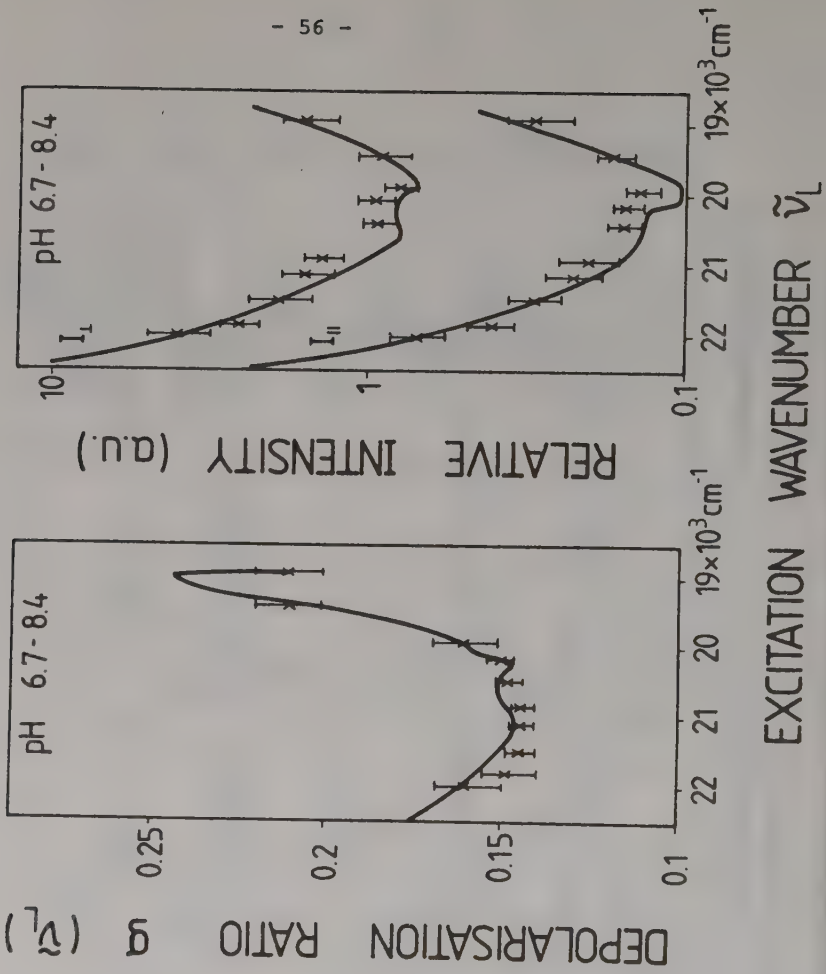


Abb. 17a:

Depolarisationsgrad
und Anregungsprofile
für $\tilde{\nu}_L = 1375 \text{ cm}^{-1}$

OxyHb,

$[Cl^-] = 0.3 - 0.5 \text{ Mol/l}$

Die angegebene Fehler-
breite entspricht der
Variation der aufge-
nommenen Werte.

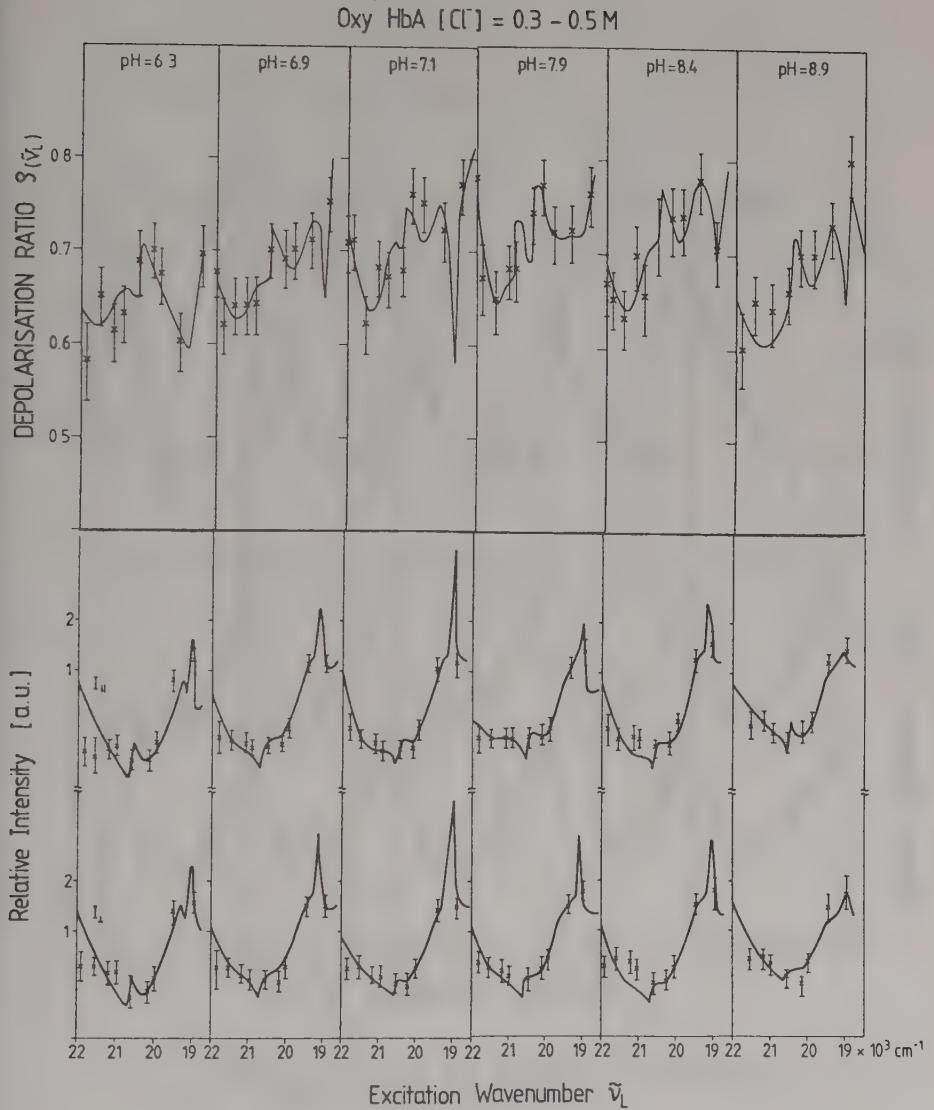


Abb. 17b: Depolarisationsgrad und Anregungsprofile
für $\tilde{\nu}_R = 1638 \text{ cm}^{-1}$, OxyHb, $[Cl^-] = 0.3 - 0.5 \text{ Mol/l}$

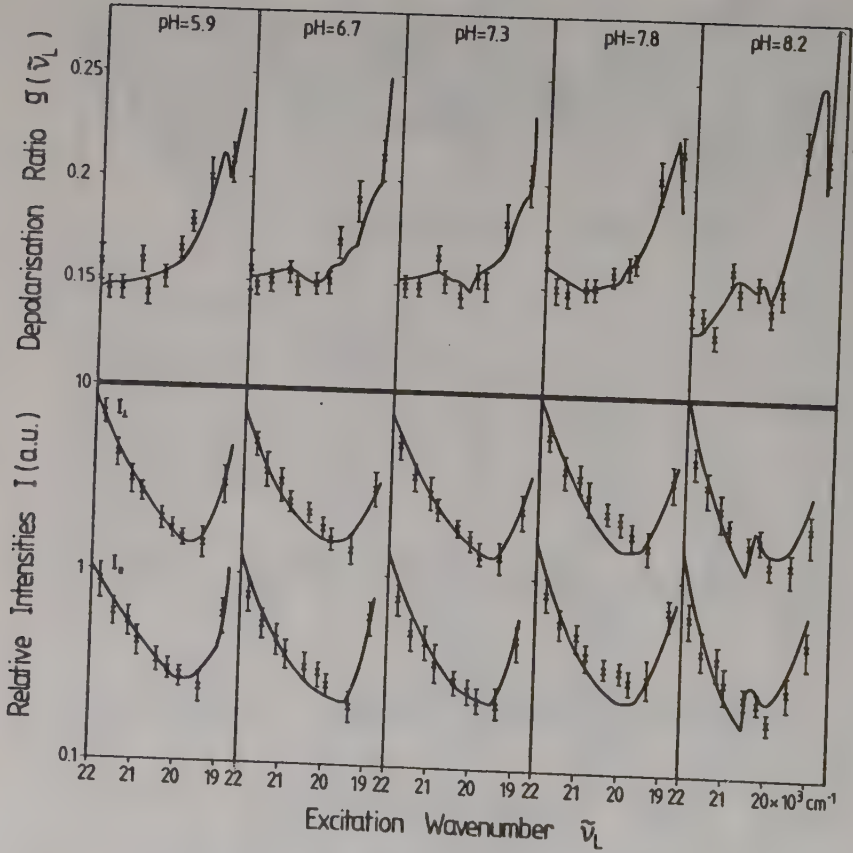


Abb. 18a: Depolarisationsgrad und Anregungsprofile
für $\tilde{\nu}_R = 1375 \text{ cm}^{-1}$, OxyHb, $[\text{Cl}^-] = 1 \text{ Mol/l}$

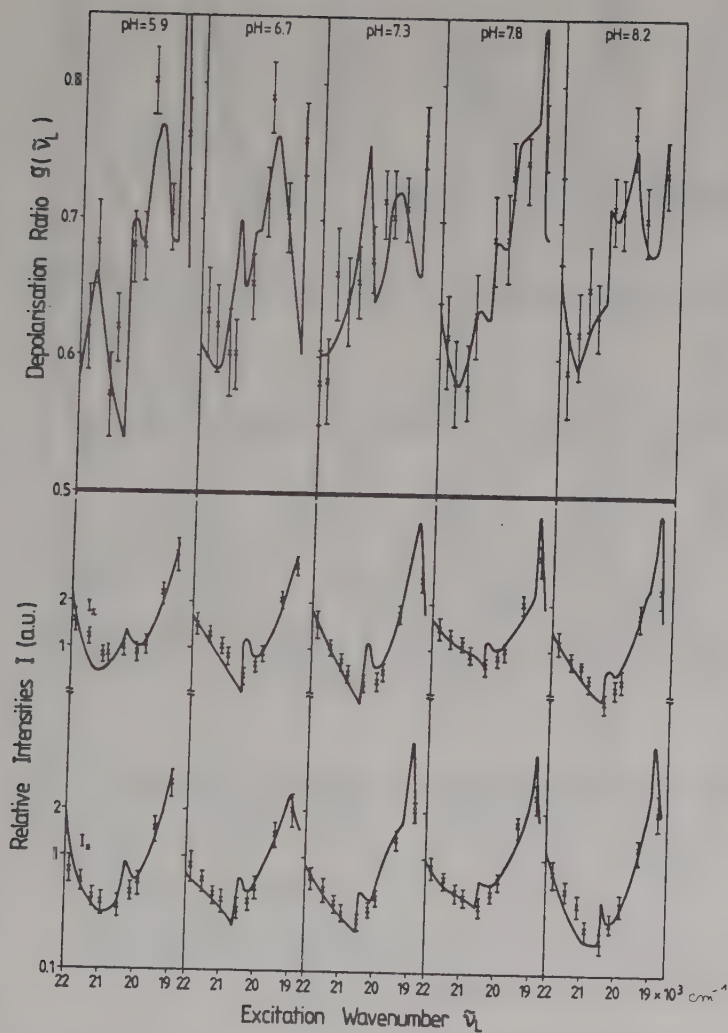


Abb. 18b: Depolarisationsgrad und Anregungsprofile
für $\tilde{\nu}_R = 1638 \text{ cm}^{-1}$, OxyHb, $[\text{Cl}^-] = 1 \text{ Mol/l}$

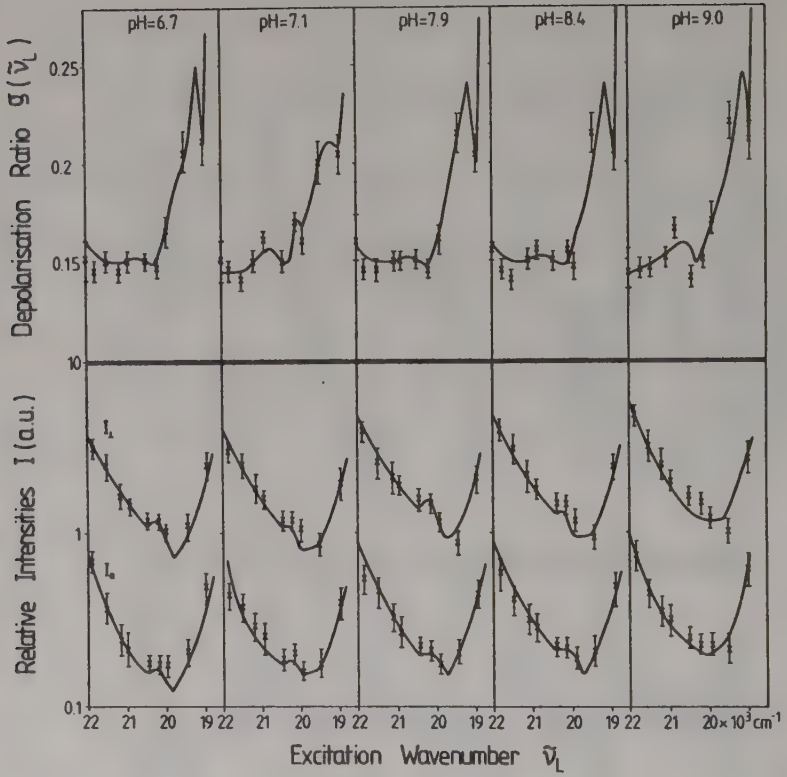


Abb. 19a: Depolarisationsgrad und Anregungsprofile
für $\tilde{\nu}_R = 1375 \text{ cm}^{-1}$, BME - OxyHb

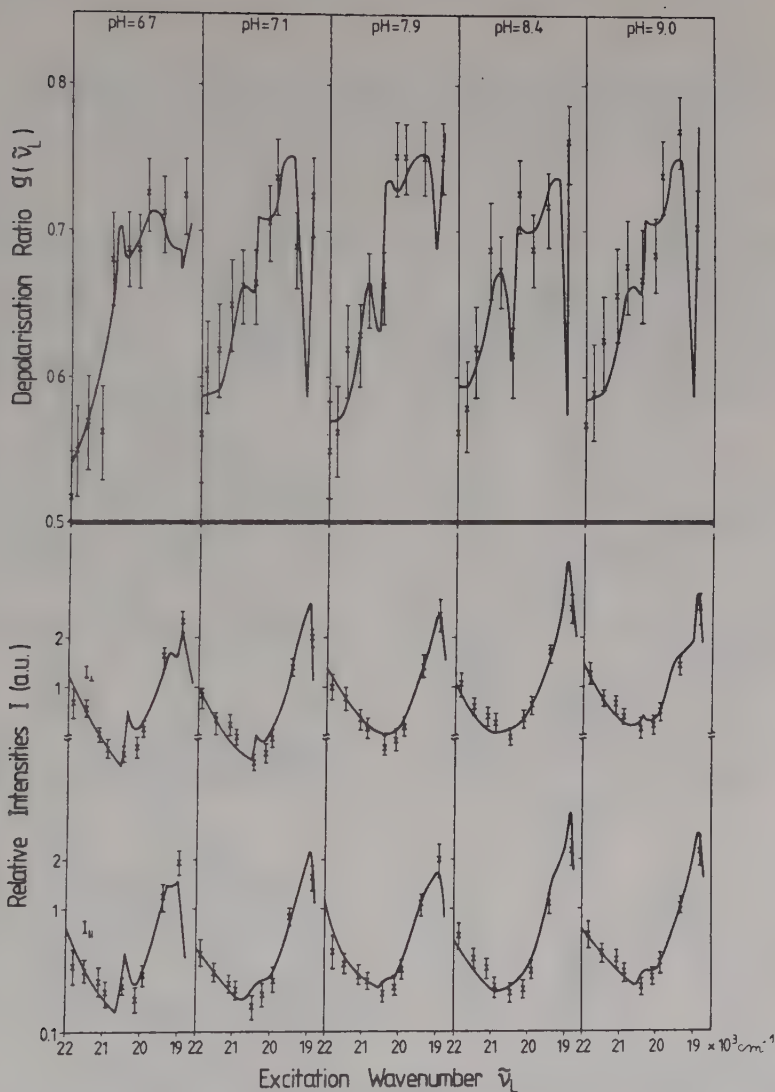
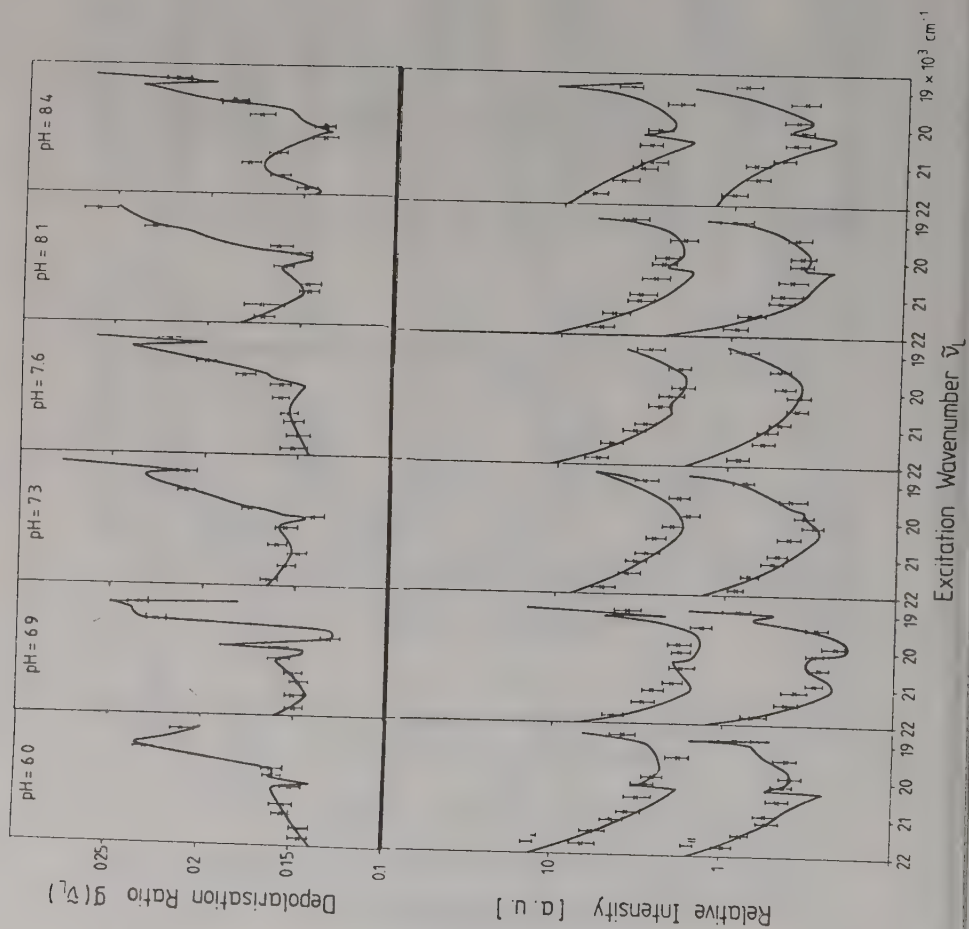


Abb. 19b: Depolarisationsgrad und Anregungsprofile
für $\tilde{\nu}_R = 1638 \text{ cm}^{-1}$, BME - OxyHb

Abb. 20a:

Depolarisationsgrad
und Anregungsprofile
für $\tilde{\nu}_K = 1375 \text{ cm}^{-1}$

NES - OxyHb



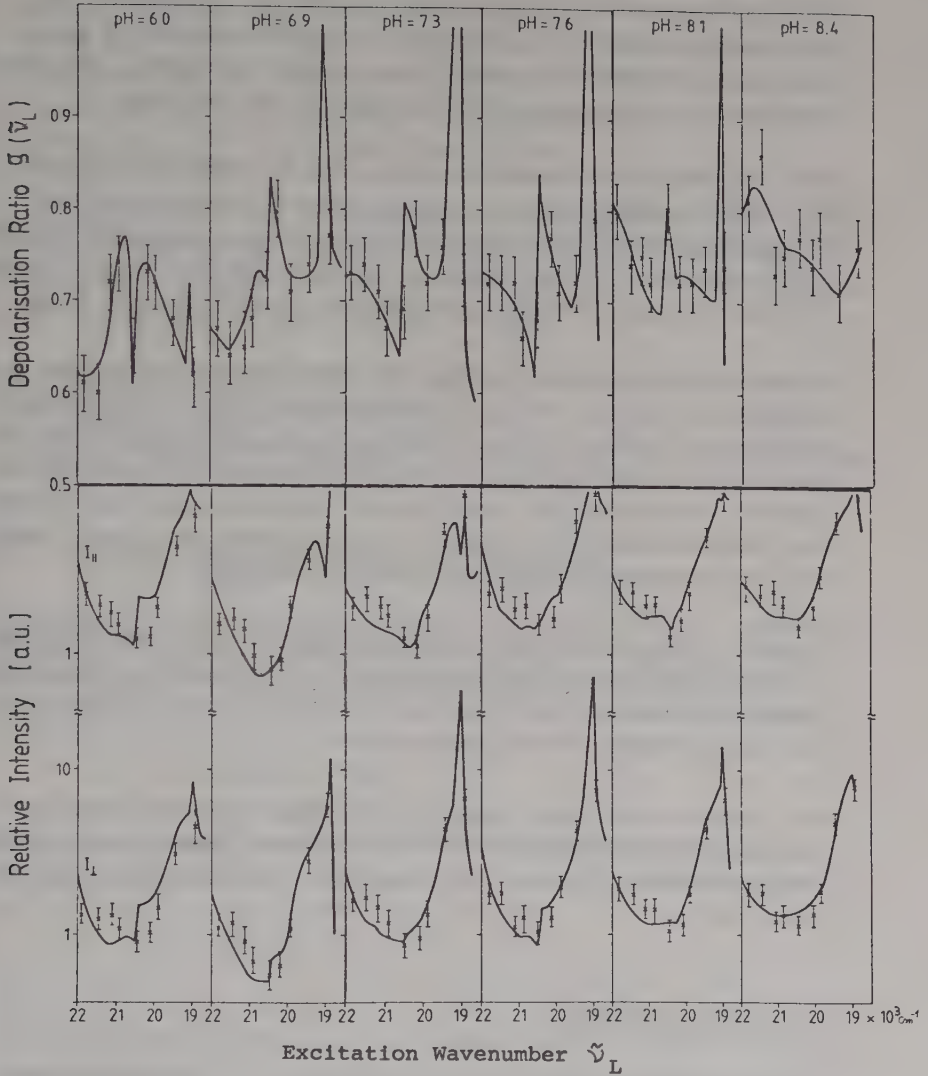


Abb. 20b: Depolarisationsgrad und Anregungsprofile
für $\tilde{\nu}_R = 1638 \text{ cm}^{-1}$ NES - OxyHb

Die durchgezogenen Linien in Abb. 16 und den folgenden Darstellungen ergeben sich aus dem Fitprogramm und zeigen eine gute Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment. Die dazu benötigten Fitkonstanten sind in Tabelle IV aufgeführt.

Abb. 17a zeigt die Dispersionskurve des Depolarisationsgrades und der Anregungsprofile im Bereich pH 6.7 bis 8.4 für eine Cl^- -Konzentration zwischen 0.3-0.5 Mol/l. Die Messungen zeigten keine Variation mit dem pH-Wert. Für die 1638-cm^{-1} Linie in Abb. 17 b ist hingegen deutlich eine solche pH-Variation zu sehen.

In Abb. 18 a,b ist der Verlauf von Depolarisationsgrad und Anregungsprofilen für eine Cl^- -Konzentration von 1 Mol/l gezeigt. Hier treten für die 1375-cm^{-1} -Linie die Variationen mit dem pH-Wert wieder auf, wenn auch für pH 6.7 bis pH 7.8 deutlich reduziert. Die Bilder für die 1638-cm^{-1} -Linie zeigen solche starken Veränderungen nicht mehr. Die Variationen sind aber, wenn man vom sauren Wert absieht, deutlich reduziert.

In Abb. 19a,b sind die Ergebnisse der Messungen für mit BME modifiziertes Hämoglobin aufgezeigt. Der Verlauf der Dispersionskurven für die 1375-cm^{-1} - und der für die 1638-cm^{-1} -Linie sind für alle pH-Werte nahezu identisch.

Abb. 20 a,b zeigt die Dispersion von Depolarisationsgrad und Anregungsprofilen für mit NEM modifiziertes Hämoglobin. Im Gegensatz zu BME-HbO₂ treten hier deutliche Variationen mit dem pH-Wert auf.

4.7. Fitkonstanten

Um vergleichbare Werte für die Konstanten C_{es}^k zu erhalten, wurden die unterschiedlichen Oszillatorenstärken mit $M_{gB} = 11.3$ Debye für die Soret- und $M_{gQ} = 1.32$ Debye für die Q-Bande berücksichtigt. Die Größe der Oszillatorenstärke wurde aus dem Absorptionsspektrum ermittelt.

Die vibronischen Kopplungselemente in Glg. 34 wurden in Einheiten von $(\pi/2\pi c \nu_{\mu})^{1/2}$ berechnet. Die so erhaltenen Fitkonstanten sind in Tabelle IV aufgeführt. Da die Intensitätsprofile nur in relativen Einheiten angegeben werden können, stellen die C_{es}^{μ} keine Absolutwerte dar.

Die Fehlerbreite der Fitkonstanten ergibt sich ebenfalls aus den Intensitätsprofilen. So schwankt von Meßreihe zu Meßreihe die gemessene Intensität, da die optische Justierung nicht identisch ist. Dieser Fehler macht bis zu 10% aus.

Die Konstanten des μ -ten Phonons enthalten diesen Fehler nicht. Sie werden in Einheiten von $(\pi/2\pi c \nu_{\mu})^{1/2}$, d.h. cm^{-1} , ebenfalls in Tabelle IV angegeben und entsprechen den Absolutwerten.

4.8. pH-Wert - Abhängigkeit der Fitparameter

Um einen besseren Überblick über das Verhalten der Fitparameter in Tabelle IV zu erhalten, wurde die Zahl der Parameter durch die Einführung folgender Größen verkleinert (s. auch Glg. 37)

$$\sum_{A_{1g}}^{\lambda} = \sum_{\substack{es \\ = Q_8}} |C_{es}^{A_{1g}, \lambda}| = A$$

$$\sum_B^{\lambda} = \sum_{\substack{es \\ = Q_8}} \frac{|C_{es}^{B_{1g}, \lambda}| + |C_{es}^{B_{2g}, \lambda}|}{2} = B$$

$$\sum_{A_{1g}}^{\lambda} = \sum_{\substack{es \\ = Q_8}} |C_{es}^{A_{1g}, \lambda}| = C$$

(Die Fitparameter für das μ -te Phonon werden durch den Index μ gekennzeichnet)

In Abb. 21a ist das Verhalten dieser neuen Parameter der 1375 cm^{-1} -Linie von Oxyhämoglobin in Lösungen unterschiedlicher Cl^- -Konzentrationen bzw. für mit BME modifiziertes Oxyhämoglobin

bei der Variation des pH-Wertes zu sehen. In Abb. 21b ist das entsprechende Verhalten für die 1638 cm^{-1} -Linie aufgezeigt. Die durchgezogenen Linien dienen nur der besseren Darstellung.

Auffallend für alle Messungen ist das gleichzeitige Auftreten von Maxima für A und Minima für B und umgekehrt innerhalb einer Ramanlinie. Die Variation der A und B spiegelt direkt die Variation der Dispersion des Depolarisationsgrades wider und macht diese deutlicher. So ist für eine Cl^- -Konzentration von 0.3-0.5 Mol/l keine Variation der Dispersion von ρ für die 1375 cm^{-1} -Linie festzustellen (Abb. 17a), A und B in Abb. 21a sind für diese Chloridkonzentration nur waagerechte Linien.

Für hohe und niedrige Cl^- -Konzentration wurde von Russu et al. (1980, 1982) eine pK-Wert Verschiebung für $\text{His HC3(146)}\beta$ gefordert. Deshalb wurde versucht, aus den Fitkonstanten für niedrige und hohe Cl^- -Konzentration pK-Werte zu ermitteln. Das dazu notwendige Verfahren wurde im 3. Kapitel vorgestellt.

Für Lösungen mit hohen Cl^- -Konzentrationen ($\text{Cl}^- = 1\text{ Mol/l}$) bzw. niedrigen Konzentrationen ($< 0,08\text{ Mol/l}$) wurde mittels Glg. 37 die pH-Abhängigkeit der Fitkonstanten der Ramanlinien selbst noch einmal gefittet, das Ergebnis ist in Abb. 22 zu sehen. Die durchgezogenen Linien entsprechen jetzt der Fitkurve.

Die dazugehörigen pK-Werte 8.2, 6.8 und 6.15 für die hohe Cl^- -Konzentration und pK = 7.8, 6.6 und 5.8 für die niedrigen Konzentrationen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Während für die niedrigen Konzentrationen beide untersuchten Linien zum Ergebnis beitragen kann wegen der mangelnden pH-Variation der 1375 cm^{-1} -Linie dies zu den Ergebnissen bei hohen Cl^- -Konzentrationen keinen Beitrag leisten.

Außer für hohe und niedrige Cl^- -Konzentrationen wurde für die pH-Werte abhängigen Fitkonstanten des NES-Oxyhämoglobins versucht, die dafür verantwortlichen pK-Werte zu finden. Sie sind pK = 6.4, 7.4 und 8.7 (s. Abb. 22a und Tabelle 5).

Tabelle 4 : $C_{es}^{\eta, \lambda}$, $C_{es}^{\eta, \mu}$ -Werte für unterschiedliche Cl^- -Konzentrationen und modifizierte OxyHb's

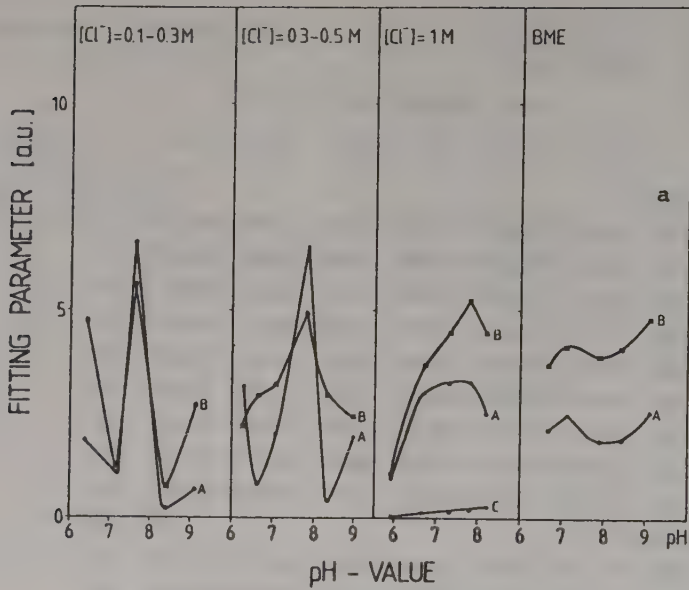
[Cl ⁻]		0.08 Mol/l					
pH-Wert		6.3	6.7	7.1	7.6	7.9	8.4
$\Omega_{\lambda} = 1375 \text{ cm}^{-1}$							
$C^{A_{\lambda}}(\text{a.u.})$	QQ	9.62	12.25	6.0	6.0	5.9	7.65
	QB	-0.40	0.88	1.63	1.63	0.57	0.47
	BB	1.36	1.84	1.97	1.97	3.05	2.96
$C^{B_{\lambda}}(\text{a.u.})$	QQ	-9.25	-13.02	-5.8	-5.8	5.26	-14.0
	QB	0.21	-0.78	1.6	1.6	0.49	-2.8
	BB	0.39	-0.38	0.81	0.81	0.72	0.34
$C^{C_{\lambda}}(\text{a.u.})$	QQ	0.24	-0.97	-1.20	-1.20	5.43	-6.14
	QB	0.31	-0.11	0.90	0.90	0.19	-1.57
	BB	0.12	0.28	-0.17	-0.17	0.08	-0.04
$\Omega_{\lambda} = 1638 \text{ cm}^{-1}$							
$C^{A_{\lambda}}(\text{a.u.})$	QQ	2.56	2.47	0.43	2.03	-1.24	2.22
	QB	-0.11	-0.04	0.14	-0.09	0.02	-0.07
	BB	1.40	-1.09	-1.83	-1.15	-0.10	0.93
$C^{B_{\lambda}}(\text{a.u.})$	QQ	-1.73	-1.44	0.96	1.01	1.26	1.56
	QB	0.09	-0.06	-0.24	0.08	0.02	0.06
	BB	1.96	1.56	2.37	1.47	-0.16	1.42
$C^{C_{\lambda}}(\text{a.u.})$	QQ	2.02	-3.60	-0.86	-0.60	0.11	0.68
	QB	1.28	0.86	0.81	0.98	0.01	0.83
	BB	-0.03	-0.001	-	-0.004	-	-
$\Omega_{\mu} = 1551 \text{ cm}^{-1}$							
$C^{A_{\mu}}(\text{cm}^{-1})$ $\times 10^3$	QQ	1.0	0.82	1.0	1.0	6.65	1.47
	QB	-0.23	0.12	0.38	0.38	1.78	0.73
	BB	-0.11	-0.24	-0.40	-0.40	-0.11	-0.21
$C^{B_{\mu}}(\text{cm}^{-1})$ $\times 10^3$	QQ	0.96	0.86	1.09	1.09	4.36	0.83
	QB	0.45	0.93	-0.23	-0.23	0.74	0.77
	BB	0.05	-0.03	0.27	0.27	-1.74	0.05
$C^{C_{\mu}}(\text{cm}^{-1})$ $\times 10^3$	QQ	0.22	0.12	0.21	0.21	0.82	0.05
	QB	0.20	0.12	-0.03	-0.03	-0.04	0.31
	BB	0.82	0.71	0.52	0.52	-3.90	0.70
$\gamma^a = 500 \text{ cm}^{-1}$; $\gamma^b = 500 \text{ cm}^{-1}$							

Tabelle 4 : Fortsetzung

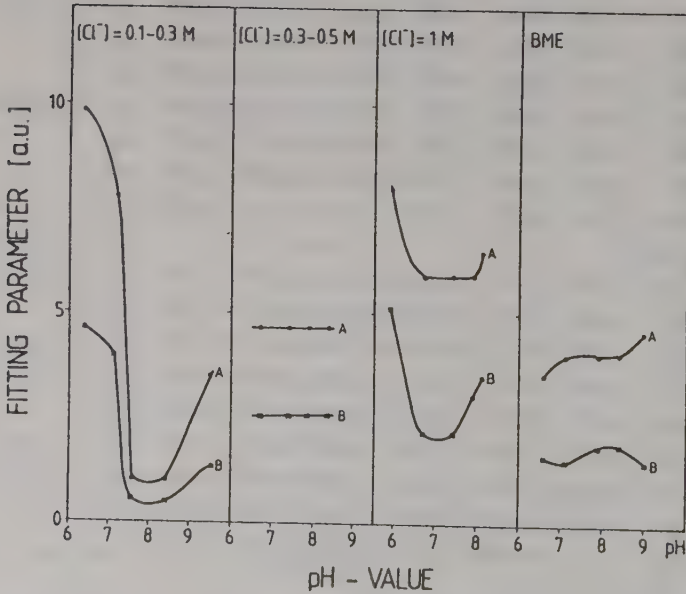
BME - OxyHb					
pH-Wert	6.7	7.1	7.9	8.4	9.0
$\Omega_R = 1375 \text{ cm}^{-1}$					
$C^{A\gamma}(\text{a.u.})$ QQ	-1.58	-1.63	-1.58	-1.58	-1.62
QB	-2.21	-2.06	-2.21	-2.21	-2.03
BB	1.39	1.61	1.39	1.39	1.61
$C^{B\gamma}(\text{a.u.})$ QQ	1.0	1.49	1.0	1.0	0.85
QB	1.9	1.37	1.9	1.9	1.29
BB	0.69	0.17	0.69	0.69	-0.002
$C^{B\beta}(\text{a.u.})$ QQ	0.78	0.55	0.78	0.78	0.49
QB	0.63	0.78	0.63	0.63	0.76
BB	0.63	0.81	0.63	0.63	0.64
$\Omega_\lambda = 1638 \text{ cm}^{-1}$					
$C^{A\lambda}(\text{a.u.})$ QQ	-1.36	-1.49	-1.04	-0.75	-1.58
QB	0.28	0.38	0.33	0.53	0.41
BB	-0.57	-0.62	-0.50	-0.54	-0.66
$C^{B\lambda}(\text{a.u.})$ QQ	3.20	3.05	2.64	2.52	3.22
QB	-0.68	-1.00	-0.69	-1.11	-1.04
BB	1.26	1.26	1.20	1.13	1.33
$C^{B\alpha}(\text{a.u.})$ QQ	1.49	3.05	-3.18	-3.45	-3.22
QB	-	-	0.04	0.02	-
BB	-	-0.0001	-0.0003	-	-0.0001
$\Omega_\mu = 1551 \text{ cm}^{-1}$					
$C^{A\mu}(\text{cm}^{-1})$ QQ		0.86			
$\times 10^3$ QB		-0.17			
BB		-0.16			
$C^{B\mu}(\text{cm}^{-1})$ QQ		0.67			
$\times 10^3$ QB		-0.31			
BB		-0.005			
$C^{B\beta}(\text{cm}^{-1})$ QQ		-0.03			
$\times 10^3$ QB		0.11			
BB		0.69			
$\gamma^a = 500 \text{ cm}^{-1}$; $\gamma^b = 500 \text{ cm}^{-1}$					

Tabelle 4 : Fortsetzung

		NES - OxyHb					
pH-Wert		6.0	6.3	7.3	7.6	8.1	8.4
$\Omega_R = 1375 \text{ cm}^{-1}$							
$C^{A_{1g}}(\text{a.u.})$	QQ	3.31	3.08	3.31	-1.78	1.41	3.08
	QB	-0.09	-1.69	-1.08	2.23	-0.62	-0.52
	BB	0.26	1.76	1.95	1.77	3.30	-0.75
$C^{B_{1g}}(\text{a.u.})$	QQ	-1.71	4.66	3.42	1.12	2.03	4.09
	QB	-0.08	0.71	0.13	2.0	0.29	0.32
	BB	-0.03	-1.09	-0.67	0.76	-1.70	1.27
$C^{B_{2g}}(\text{a.u.})$	QQ	-2.72	3.71	-4.54	0.86	0.55	0.03
	QB	0.02	-0.72	-1.13	0.70	-0.17	-0.24
	BB	0.06	-0.07	0.01	0.70	-0.28	0.09
$\Omega_R = 1638 \text{ cm}^{-1}$							
$C^{A_{1g}}(\text{a.u.})$	QQ	-6.26	4.27	-0.46	-0.56	0.12	1.84
	QB	0.18	-0.32	-0.23	0.06	0.02	0.07
	BB	1.09	-0.02	0.27	-0.76	0.92	2.06
$C^{B_{1g}}(\text{a.u.})$	QQ	-4.87	14.28	5.86	5.50	4.69	-1.19
	QB	0.38	0.23	0.33	-0.07	-0.66	0.02
	BB	1.89	0.16	0.53	0.29	1.90	-2.93
$C^{B_{2g}}(\text{a.u.})$	QQ	11.4	2.72	5.7	0.10	1.77	3.25
	QB	0.08	0.01	1.1	-0.14	-0.31	-0.31
	QB	0.23	1.26	1.67	1.85	0.23	0.59
$C^{A_{1g}}(\text{a.u.})$	QB	0.21	-0.47	2.14	1.78	-0.27	0.18
$\Omega_\mu = 1551 \text{ cm}^{-1}$							
$C^{A_{1g}}(\text{cm}^{-1})$	QQ	-0.16	0.18	0.67	0.86	0.18	0.03
	QB	-0.23	-0.23	0.04	-0.17	-0.23	-0.23
	BB	-0.59	-0.16	-0.06	-0.16	-0.16	-0.10
$C^{B_{1g}}(\text{cm}^{-1})$	QQ	0.60	0.60	0.25	0.67	0.6	0.60
	QB	-0.21	-0.21	-0.12	-0.31	-0.21	-0.21
	BB	0.60	0.60	0.25	0.67	0.60	0.60
$C^{B_{2g}}(\text{cm}^{-1})$	QQ	-0.80	-0.80	0.23	-0.32	-0.80	-0.80
	QB	0.23	0.23	0.19	0.14	0.23	0.23
	BB	3.37	0.68	0.05	0.68	0.68	3.93
$\gamma^A = 500 \text{ cm}^{-1} \quad ; \quad \gamma^B = 500 \text{ cm}^{-1}$							



a) 1638 cm^{-1}



b) 1375 cm^{-1}

Abb 21a,b: $\sum_{A,9}^R(\text{pH})$ (= A), $\sum_B^R(\text{pH})$ (= B) - Diagramm

Daten für $\text{Cl}^- = 0.1\text{-}0.3 \text{ Mol/l}$ (Schweitzer-Stenner)

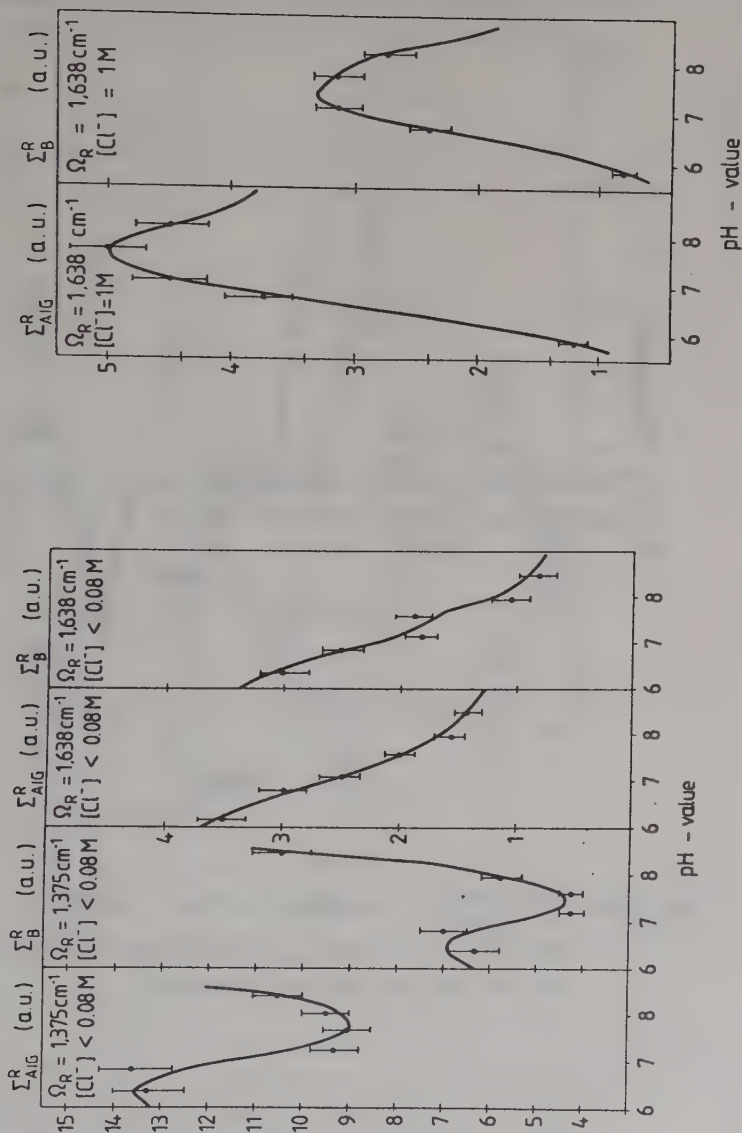


Abb. 22a: $\bar{Z}_{\lambda_{43}}^R(\text{pH}), \bar{Z}_{\lambda_{43}}^R(\text{pH})$ - Diagramm für OxyHb bei unterschiedlicher Cl^- - Konzentration

Die durchgezogene Linie wurde mit dem Titrationsmodell berechnet.

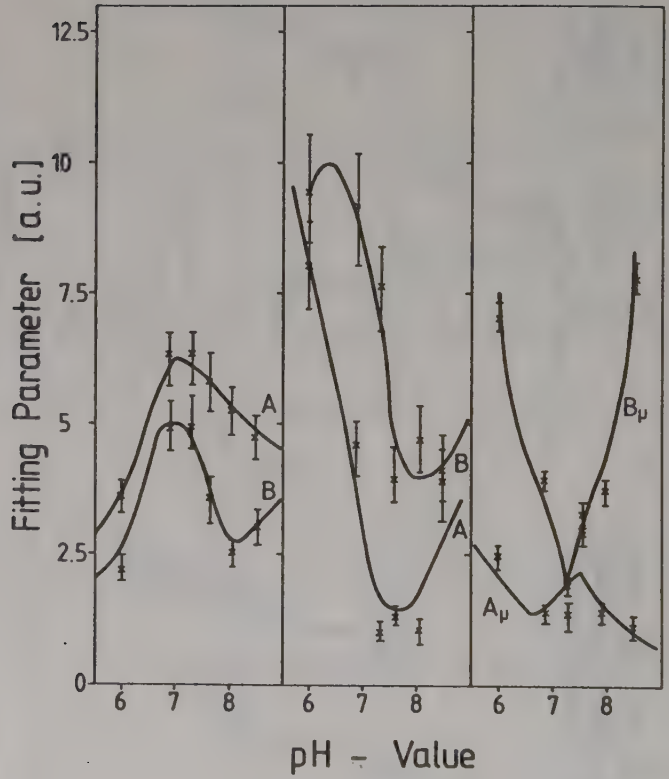


Abb. 22b: $\bar{\Sigma}_{A_{1g}}^{N(\mu)}(\text{pH})$, $\bar{\Sigma}_B^{N(\mu)}(\text{pH})$ - Diagramm für NES - OxyHb
der 1375 cm⁻¹ (links)-, der 1638 cm⁻¹ (Mitte)-Linie
und des μ -ten Phonons (rechts)

Die Interpretation der Meßdaten und die Zuordnung von pK-Werten zu Aminosäuren erfolgt im nächsten Kapitel.

Tabelle 5: Die berechneten Tensorparameter der unterschiedlichen Tirationszustände

$[Cl^-] < 0.08 \text{ Mol/l}$

$$\Omega_R = 1375 \text{ cm}^{-1}, \quad \sum_{A_2}^R \text{ (pH)} \quad \sum_B^R \text{ (pH)}$$

$\sum^R(000)$	11.0	6.0
$\sum^R(001)$	6.0	1.5
$\sum^R(011)$	21.0	11.0
$\sum^R(111)$	6.0	3.0

$\Omega_R = 1638 \text{ cm}^{-1}$

$\sum^R(000)$	1.3	0.5
$\sum^R(001)$	2.0	1.9
$\sum^R(011)$	4.3	3.5
$\sum^R(111)$	4.3	3.5

$$pK_1 = 7.8$$

$$pK_2 = 6.6$$

$$pK_3 = 5.8$$

Tabelle 5: Fortsetzung

$$\underline{\text{Cl}^-} = 1 \text{ Mol/l}$$

$$\Omega_{\lambda} = 1375 \text{ cm}^{-1}$$

Für diese Ramanlinie wurden keine pH-Variationen des Depolarisationsgrades und somit der Fitparameter festgestellt.

$\Omega_{\lambda} = 1638 \text{ cm}^{-1}$	$\bar{\Sigma}_{\lambda_{\text{AS}}}^{\lambda} (\text{pH})$	$\bar{\Sigma}_{\lambda}^{\lambda} (\text{pH})$
$\bar{\Sigma}^{\lambda} (000)$	1.68	0.5
$\bar{\Sigma}^{\lambda} (100)$	5.9	3.8
$\bar{\Sigma}^{\lambda} (110)$	1.3	0.5
$\bar{\Sigma}^{\lambda} (110)$	0.1	0.5

$$\text{pK}_1 = 8.2$$

$$\text{pK}_2 = 6.8$$

$$\text{pK}_3 = 6.15$$

NBS - OxyHb

$\Omega_{\lambda} = 1375 \text{ cm}^{-1}$	$\bar{\Sigma}_{\lambda_{\text{AS}}}^{\lambda} (\text{pH})$	$\bar{\Sigma}_{\lambda}^{\lambda} (\text{pH})$
$\bar{\Sigma}^{\lambda} (0000)$	4.2	4.4
$\bar{\Sigma}^{\lambda} (0001)$	5.28	≤ 1.0
$\bar{\Sigma}^{\lambda} (0011)$	5.82	5.57
$\bar{\Sigma}^{\lambda} (0010)$	4.2	4.4
$\bar{\Sigma}^{\lambda} (0111)$	2.14	≤ 1.0
$\bar{\Sigma}^{\lambda} (1011)$	3.3	2.4
$\bar{\Sigma}^{\lambda} (1111)$	1.2	≤ 1.0

Tabelle 5: Fortsetzung

NES -OxyHb

$\Omega_R = 1638 \text{ cm}^{-1}$	$\Sigma_{A_{43}}^R \text{ (pH)}$	$\Sigma_B^R \text{ (pH)}$
$\Sigma^R (0000)$	4.3	6.7
$\Sigma^R (0001)$	1.0	1.0
$\Sigma^R (0011)$	4.5	1.0
$\Sigma^R (0010)$	4.3	6.7
$\Sigma^R (0111)$	4.5	7.5
$\Sigma^R (1011)$	1.0	4.7
$\Sigma^R (1111)$	10.6	1.0

$$\text{pK}_1 = 8.7$$

$$\text{pK}_2 = 7.4$$

$$\text{pK}_3 = 6.4$$

$$\text{pK}_4 = 6.3$$

5. Diskussion

In diesem Kapitel sollen die Meßergebnisse aus dem vorherigen Kapitel diskutiert werden. Bevor auf die physiologische Bedeutung der ermittelten pK-Werte eingegangen wird, soll zuerst auf das im Rahmen des 4-Orbitalmodells ungewöhnliche Verhalten der Fitkonstanten hingewiesen werden. Dann erfolgt eine Beschreibung der unterschiedlichen Kopplung zwischen Protein und Hämgruppe für die beiden untersuchten Ramanlinien.

Der größte Teil der Diskussion ist aber der Bedeutung der Meßergebnisse für das Verständnis der Hämoglobinfunktion gewidmet.

5.1. Gültigkeit des 4-Orbital-Modells

Das 4-Orbital-Modell von Gouterman fordert ein festes Verhältnis der Fitkonstanten $C_{\alpha\alpha}^{r_h, r_v}$ und $C_{\beta\beta}^{r_h, r_v}$ zueinander, s. Anhang. Für die Fitkonstanten in Tabelle 4 gilt dies allerdings nicht. Die unterschiedlichen Fitkonstanten für die $C_{\alpha\alpha}^{r_h, r_v}$ und $C_{\beta\beta}^{r_h, r_v}$ spiegeln vielmehr die Grenzen des 4-Orbital-Modells von Gouterman für die Beschreibung der elektronischen Struktur der Hämgruppe wider. Diese Einschränkung wird auch in den Rechnungen von Cheung (1978) und Shelnutt (1981) erwähnt. Ihnen gelang der Fit der Anregungsprofile von Metalloporphyrinen im Bereich der B-Bande nur, wenn die aus dem 4-Orbital-Modell abgeleiteten Gesetzmäßigkeiten aufgehoben werden.

Ein weiteres Indiz dafür, daß die B-Bande nicht vollständig durch das 4-Orbital-Modell beschrieben wird, sind die Ergebnisse von Brunzel (1985). Hier wurde die pH-Abhängigkeit der Oszillatorenstärken der Q- und B-Bande gemessen und festgestellt, daß bei wachsender Oszillatorenstärke der Q-Bande auch die Intensität der B-Bande ansteigt. Im Rahmen des 4-Orbital-Modells müßte dies aber absinken, weil die Q-Bande ihre Intensität ja nur durch vibronische Kopplung aus der B-Bande gewinnt.

Die B-Bande erhält ihre Intensität wahrscheinlich aus der N- und L-Bande, die durch Konfigurationswechselwirkung der ($a_{2u}eg$) und ($b_{2u}eg$) entstehen (Hsu, 1970). Petke et al. (1978) zeigten dies in ihren Rechnungen für Porphin und Magnesium-Porphin. Ihre ab initio CI Rechnungen sind aber nicht direkt auf das Protoporphyrin IX übertragbar. Im Bereich zwischen Q- und B-Bande und vor allem im Bereich der Q-Banden ist das 4-Orbital-Modell aber ausreichend (Cheung, 1978).

5.2. Kombinations- und Obertöne

Aufgabe war es, mit Hilfe der resonanten Ramanspektroskopie Symmetriestörungen der Hämgruppe nachzuweisen. Wenn solche Symmetriestörungen über das Matrixelement $\langle e | \frac{\partial^2 H}{\partial Q_i \partial Q_j} | s \rangle$ zum Polarisierbarkeitstensor beitragen (Glg.34), müssen sich auch Ober- und Kombinationstöne, die durch das gleiche Matrixelement repräsentiert werden (Long 1977), nachweisen lassen. Darum wurde das Spektrum von OxyHb zwischen 2500 cm^{-1} und 3400 cm^{-1} aufgenommen. Es ist in Abb. 23 zu sehen. Eine eindeutige Zuordnung von Ramanschwingungen bleibt spekulativ. So ist eine Aussage, welche Normalschwingungen des Typs Γ_{1g} bzw. Γ_{2g} besonders stark zur Symmetrieverzerrung des Häms beitragen, nicht möglich. Wahrscheinlich treten Mischungen mit den Normalschwingungen von der 1584 cm^{-1} (A_{2g})- und der 1638 cm^{-1} (B_{1g})-Linie auf aber keine mit der Schwingung bei 1375 cm^{-1} . Dabei muß berücksichtigt werden, daß mit $\lambda_c = 528,5 \text{ nm}$ stark im präresonanten Bereich der Q-Bande eingestrahlt wird, die 1375 cm^{-1} -Linie ihre größere Verstärkung aber aus der B-Bande erhält.

5.3. Unterschiedliche Kopplungsmechanismen für die Normalschwingungen bei 1375 cm^{-1} und 1638 cm^{-1}

Wie schon in 2.4.4. bemerkt, werden durch die Seitengruppen des Protoporphyrins IX Symmetriestörungen des A_{1g} , B_{1g} , A_{2g} und B_{2g} Typs induziert. Deshalb sollten zu den Fitparametern, die die

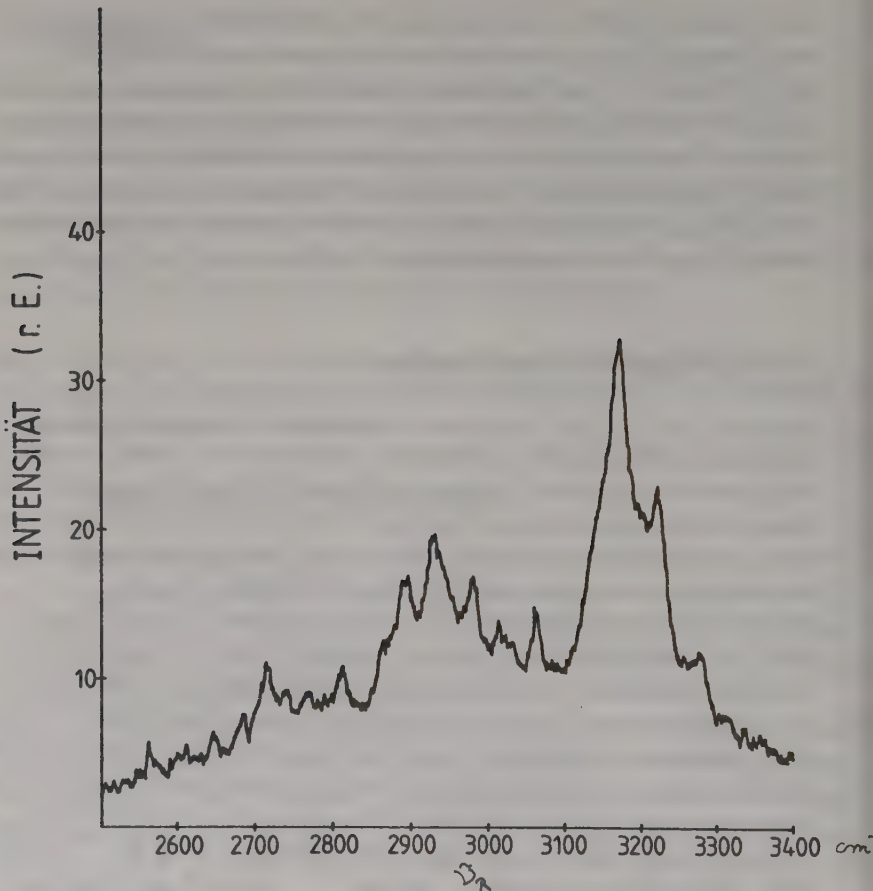


Abb. 23: Ramanspektrum von Oxyhämoglobin zwischen 2500 - 3400 cm⁻¹, $\lambda_L = 528.5$ nm, $P_L = 200$ mW
Die gewählte Hämkonzentration ist mit 7,8 mM/l relativ hoch gewählt worden, um die Ramanstreuung des Wassers in diesem Bereich durch Absorption zu unterdrücken.

Anregungsprofile und Depolarisationsgrade der 1375 cm^{-1} Linie beschreiben und linear von diesen Störungen abhängen, alle vier Typen beitragen. Tatsächlich wurden für die 1375 cm^{-1} -Linie aber nie A_{2g} -Störungen festgestellt. Diese Beiträge fehlen ebenso für Deoxyhämoglobin (Schweitzer-Stenner et al., 1984a) und für Myoglobin (el Naggar et al. 1984).

Das Kopplungselement $C_{\alpha\beta}^{R,A_{2g}}$ muß deshalb speziell für diese Ramanlinie sehr klein sein. Es gilt $C_{es}^{R,A_{2g}} \sim \vec{t}_i \cdot \vec{t}_j$ (s.Ausblick). Die $t_{x,y}^i$ stehen für die Auslenkungen der Atome bei der Ramanschwingung, die $t_{x,y}^j$ für die der Verzerrung. Die Größe des Kopplungselements für die 1375 cm^{-1} -Linie kann deshalb durch eine detailierte Betrachtung des Normalmodenbildes von Abe (1978), Abb.15a, abgeschätzt werden.

Große Amplituden können nur für die vier Stickstoffatome und die Kohlenstoffatome C_α der Pyrrole, die zu den Stickstoffatomen binden, festgestellt werden. Die C_β -Atome der Pyrrolringe, die zu den Seitengruppen binden, hingegen zeigen nur kleine Amplituden. Da Störungen durch die Seitengruppen aber große Verzerrungen an den C_β verursachen, die Amplituden dort aber klein sind, ist auch das Kopplungselement klein.

Aus der Größe der jeweiligen Amplituden der 1375 cm^{-1} -Linie kann deshalb geschlossen werden, daß die Störungen über die Seitenketten durch das Verhalten der 1375 cm^{-1} -Linie nicht vollständig wiedergegeben werden können.

Störungen hingegen, die über die kovalente Bindung des Eisens zum Stickstoff des proximalen Histidins eingekoppelt werden, können mit der 1375 cm^{-1} -Linie beobachtet werden, da sich diese zuerst an den Stickstoffen bemerkbar machen. Solche Störungen beinhalten aber keinen A_{2g} -Beitrag (s. 2.4.4.). Das Verhalten der 1375 cm^{-1} -Linie spiegelt deshalb am meisten Veränderungen wider, die zentral über das Eisenatom eingekoppelt werden.

Anders verhält sich die Situation bei der 1638 cm^{-1} (B_{1g})-Linie. Hier sind die Amplituden an den ζ_{β} groß, so daß diese Linie empfindlich auf Störungen reagiert, die peripher über die Seitengruppen eingekoppelt werden. Darum werden hier Symmetriestörungen aller vier Typen A_{1g} , B_{1g} , A_{2g} und B_{2g} festgestellt.

Besonders gut werden die unterschiedlichen Kopplungsmöglichkeiten für die Messungen an Oxyhämoglobin bei Cl^{-} -Konzentrationen von 0.3-0.5 Mol/l wiedergegeben. Hier werden keinerlei Störungen über die $\text{Fe-N(HisF8)}_{\beta}$ -Bindung in die Hämgruppe eingekoppelt, denn für die 1375 cm^{-1} -Linie konnten keine pH-abhängigen Variationen festgestellt werden (Abb. 17a). Das Hämoglobin zeigt aber durchaus noch eine pH-abhängige Sauerstoffaffinität (Rollema, 1975). Tatsächlich zeigen Anregungsprofile und Depolarisationsgrad der 1638 cm^{-1} -Linie weiterhin eine pH-Variation (Abb. 17b). Die Veränderung des Proteins durch den pH-Wert wird für diese Chloridkonzentration also hauptsächlich peripher durch die Seitengruppe eingekoppelt.

5.4. BME-Oxyhämoglobin

Bekanntlich zeigt BME-OxyHb keinen Bohreffekt und keine Kooperativität (s. 1.3.1.). Mangelnde pH-Variation tritt auch in den Messungen des Depolarisationsgrades für die 1375 cm^{-1} und die 1638 cm^{-1} -Linie im Bereich zwischen $\text{pH} = 6.7$ und $\text{pH} = 8.4$ (Abb. 21 a,b) auf. Nur für $\text{pH} = 9.0$ wurde ein Abnehmen der B_{1g} , B_{2g} -ähnlichen Verzerrungen festgestellt, die aber auf Dimerisierungsprozesse zurückzuführen sind (Antonini, Brunori 1971).

Nach diesen Messungen ist es deshalb zulässig, die bisher festgestellten pH-abhängigen Verzerrungen der Hämgruppe im OxyHb, die auf einen pH-abhängigen R-Zustand hinweisen, mit dem Bohreffekt in Verbindung zu setzen, daß heißt modifizierte Hämoglobine ohne Bohreffekt weisen auch keinen pH-Wert-variablen R-Zustand auf.

Die mangelnde pH-Variation kann nicht nur mit dem Fehlen der Salzbrücke erklärt werden, da es Systeme gibt, z.B. Hb-Cowtown, denen diese Salzbrücke zwar fehlt, deren Bohreffekt aber nur reduziert ist (Perutz et al., 1984).

Die pH-Variationen des Depolarisationsgrades im OxyHb sind auf unterschiedliche Titrationsprozesse der Aminosäuren zurückzuführen. Nach wie vor (de)protonieren diese Aminosäuren auch im BME-OxyHb, nur können die dadurch im Protein erzeugten Veränderungen nicht mehr an die Hämgruppe weitergeleitet werden, wie durch die fehlende Variation des Depolarisationsgrades und damit der Verzerrungen festgestellt worden ist.

Eine Erklärung für dieses Verhalten ist die kovalente Bindung des BME's zu Cys F9(93) β und His FG4(97) β , dadurch wird die Beweglichkeit der F-FG-Helix stark eingeschränkt. Dieser Bereich der β -Helix steht über das proximale Histidin HisF8(92) β auch in direktem Kontakt zur Hämgruppe.

Die Beweglichkeit in diesem Bereich ist nach Englander (1983) wesentlich für die Konformationsänderungen im Hämoglobin. Er stellte fest, daß der Protonenaustausch im Bereich der F-FG-Helix, bedingt durch die verminderte Beweglichkeit, im Deoxyhämoglobin im Vergleich zum Oxyhämoglobin um den Faktor 30 vermindert wird.

Das FG-Scharnier ist ein wichtiges Glied für das Verständnis des Hämoglobins. Wird das FG-Scharnier seiner Funktion als Scharnier durch BME enthoben, verliert der R-Zustand im Hämoglobin seine pH-Abhängigkeit und das Hämoglobin seine Eigenschaft als Sauerstofftransportmolekül.

5.5.1. Einfluß der Chloridkonzentration auf die statischen Verzerrungen der Hämgruppe

Nach de Bruin (1973) verändert die Chloridkonzentration den pK-Wert einiger der für den Bohreffekt wichtigen Aminosäuren. Darum

sollte untersucht werden, ob sich pK-Wert-Änderungen bei den Anregungsprofilen und Depolarisationsgraden bemerkbar machen. Tatsächlich werden deutliche Unterschiede der pH-Variationen der Dispersion der Depolarisationsgrade und der damit berechneten Fitkonstanten für unterschiedliche Chloridkonzentrationen festgestellt (Abb. 16-18).

Die Veränderungen der pH-Abhängigkeit des R-Zustandes mit der Cl^- -Konzentration weisen eine gewisse Ähnlichkeit mit der Cl^- -Abhängigkeit des Bohreffektes auf. Letzterer ist bei einer $[\text{Cl}^-] = 0.1 \text{ Mol/l}$ maximal, die größte pH-Variation des R-Zustandes wird hingegen bei $[\text{Cl}^-] = 0.1\text{-}0.3 \text{ Mol/l}$ beobachtet. Diese Verschiebung läßt sich verstehen, wenn man bedenkt, daß der Cl^- -Einfluß auf den Bohreffekt von der unterschiedlichen Cl^- -Bindungsaffinität zwischen T- und R-Zustand abhängt. Die Bindung von Cl^- -Ionen im oxygenierten R-Zustand dürfte hingegen zwischen $0.2\text{-}0.3 \text{ Mol/l}$ stattfinden, was gut mit den Messungen übereinstimmt.

Besonders auffällig ist der unterschiedliche Kopplungsmechanismus für Cl^- -Konzentrationen oberhalb bzw. unterhalb 0.3 Mol/l . Der Depolarisationsgrad der 1375 cm^{-1} -Linie, Sensor für die zentrale Kopplung, zeigt oberhalb einer Cl^- -Konzentration von 0.3 Mol/l keinerlei pH-Variation zwischen $\text{pH} = 6.0$ und $\text{pH} = 8.0$. Die Variation außerhalb dieser pH-Werte ist auf Dimerisierung zurückzuführen (Wedekind et al. 1985). Der Depolarisationsgrad der 1638 cm^{-1} -Linie, Sensor für die periphere Kopplung, zeigt erst bei einer Cl^- -Konzentration von 1 Mol/l eine Reduzierung der pH-Variation.

Die Vermutung liegt nahe, daß das Fehlen des zentralen Kopplungsmechanismus oberhalb von $[\text{Cl}^-] = 0.3 \text{ Mol/l}$ auf den von Russu et al. geforderten Bruch der Salzbrücke His HC3(146) β -Asp FG1(94) bei $[\text{Cl}^-] = 0.4 \text{ Mol/l}$ zurückzuführen ist. Sollte sich dieser Sachverhalt bestätigen, wäre die Salzbrücke ein Trigger für die 1375 cm^{-1} -Linie.

Russu et al. forderten eine pK-Wert-Verschiebung des His HC3(146) β von pK = 7.8 nach pK = 7.2 für $[Cl^-] < 0.08$ Mol/l nach $[Cl^-] = 0.2$ Mol/l und einer Phosphatkonzentration von 0.2 Mol/l. Deshalb wurde versucht, mit Hilfe des im Kap. 3 vorgestellten Modells die pH-Abhängigkeit der Fitkonstanten für die niedrigste und die höchste Chloridkonzentration zu fitten, um daraus pK-Werte zu erhalten, die eine Veränderung bestätigen (s. Abb. 22). Die aus dem Fit erhaltenen pK-Werte sind für eine Cl^- -Konzentration kleiner als 0.08 Mol/l pK = 7.8, 6.6 und 5.8 und für die Cl^- -Konzentration von 1 Mol/l pK = 8.2, 6.8 und 6.5. Der pK-Wert von 7.8, der bei niedrigen Cl^- -Konzentrationen dem His HC3(146) β bei bestehender Salzbrücke zugeordnet wurde, tritt bei hohen Cl^- -Konzentrationen nicht mehr auf.

Um die aus den RRS-Messungen gewonnenen pK-Werte, die wesentlichen Einfluß auf die Verzerrung der Hämgruppe haben, zu verifizieren, werden sie im nächsten Kapitel mit den pK-Werten aus anderen Messungen verglichen.

5.5.2. Vergleich der Ramandaten mit Daten aus optischen und kinetischen Messungen - ein neues Modell für den Bohreffekt

Aus den Messungen und den Berechnungen der pH-Abhängigen Depolarisationsgradkurven des Oxyhämoglobins konnte der Einfluß dreier Aminosäuren auf die Symmetrieeigenschaften der Hämgruppe festgestellt werden. Um die daraus gewonnenen Ergebnisse in einen biophysikalischen Zusammenhang zu stellen, werden diese mit den Ergebnissen anderer Experimente verglichen, die ebenfalls die pH-Abhängigkeit des ligandierten R-Zustandes beobachten.

Parallel zu diesen Ramanmessungen am Oxyhämoglobin wurde in unserer Arbeitsgruppe (Brunzel 1985) die pH-Abhängigkeit der B- und der beiden Q-Banden im Absorptionsspektrum zwischen pH = 4.0 und pH = 9.0 für niedrige Cl^- -Konzentrationen gemessen. Sie lieferte pK-Werte von 4.3, 5.3, 6.8 und 7.8 und stimmt gut mit den Werten aus Ramanmessungen überein. Der Wert pK = 4.3

konnte hier nicht festgestellt werden, da keine Ramanmessungen unterhalb $\text{pH} = 5.5$ vorliegen. Die Ramanmessungen dauerten im Gegensatz zu den Absorptionsmessungen (10 min) ca. 8 h, in dieser Zeit führte der niedrige pH-Wert zu nicht mehr vernachlässigbarer Met-Bildung im Hämoglobin. Ein Herausrechnen dieses Met-Anteils wie in den Absorptionsspektren ist im Ramanspektrum wegen der fehlenden Daten aber nicht möglich. Oberhalb $\text{pH} = 5.5$ lag der Met-Anteil immer unter 5%. Die Abweichung des Depolarisationsgrades vom Met-Hämoglobin und Oxyhämoglobin beträgt für die 1375 cm^{-1} -Linie (andere Ramanlinien haben keine identische Position) höchstens 40%, der Fehler für den Depolarisationsgrad läge dann bei 2%. Dieser Fehler liegt im Rahmen der Meßgenauigkeit.

De Young et al. (1976) und Kwiatkowski und Noble (1982) berichten über Kinetikmessungen, um die Dissoziations- und Assoziationskonstanten für die Ligandierung der vierten Untereinheit bei niedriger Cl^- -Konzentration zu ermitteln. Sie entdeckten eine starke pH-Abhängigkeit zwischen $\text{pH} = 6.0$ und $\text{pH} = 8.0$, s. Abb. 24.

Die Dissoziationskonstanten, l_4 , von CO und O_2 nehmen von $\text{pH} = 6.0$ zu $\text{pH} = 8.0$ ab. Die Assoziationskonstante l'_4 von CO hingegen ist für $\text{pH} = 6.0$ minimal und wächst in Richtung $\text{pH} = 8.0$ deutlich an. Die Gleichgewichtskonstante $K = \frac{l_4}{l'_4}$ zeigt deshalb im sauren und im basischen Teil ein Minimum, s. Abb. 25.

Bedenkt man, daß die Hämoglobinmoleküle in unterschiedlichen Titrationszuständen, n_v , vorliegen (s. Kap. 3) und die Assoziations- bzw. Dissoziationsprozesse für diese Zustände verschieden sind, so erhält man für das Verhalten der ligandierten vierten Untereinheit (HbL_4) bzw. unligandierten Untereinheit (HbL_3) folgende Ausdrücke, Schweitzer-Stenner et al. (1985):

$$\frac{[\text{HbL}_4](t)}{[\text{HbL}_4]_0} = \sum_v \frac{n_v}{N} e^{-l_{4v}t} = e^{-l_{4\text{eff}}t}$$

$$\frac{[\text{HbL}_3](t)}{[\text{HbL}_3]_0} = \sum_v \frac{n_v}{N} e^{-l'_{4v}[H]t} = e^{-l'_{4\text{eff}}[H]t}$$

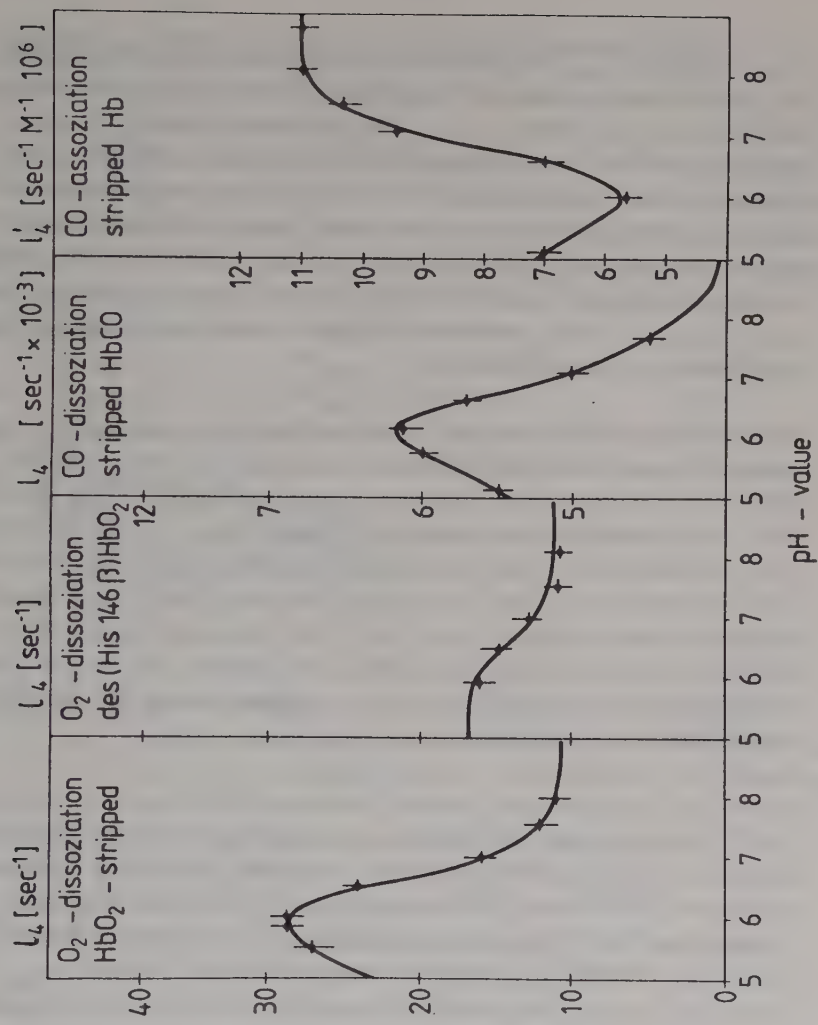


Abb. 24:

(a-c) pH-Abhängigkeit der O₂-CO-Dissoziationskonstanten für die 4. Untereinheit des Hb's.
 d) - CO-Assoziationskonstante

$l'_{4 \text{ eff}}$ und $l_{4 \text{ eff}}$ repräsentieren effektive Ratenkonstanten. Mit den pK-Werten aus den Ramandaten konnten die pH-abhängigen Werte von $l_{4 \text{ eff}}$ bzw. $l'_{4 \text{ eff}}$ mit einem Satz von l_{4v} , l'_{4v} gefittet werden. Das Ergebnis wird durch die durchgezogenen Linien in Abb. 24 wiedergegeben. Um die Eindeutigkeit dieser Fits zu testen, wurde versucht, diese Kurve mit anderen pK-Werten zu erhalten. In allen Fällen verringerte sich die Übereinstimmung zwischen Experiment und Theorie. Die berechneten Werte l_{4v} , l'_{4v} der unterschiedlichen Titrationszustände sind in der Tabelle 6 zusammengefaßt.

Um die titrierbaren Gruppen, die für die pH-Abhängigkeit verantwortlich sind, zu identifizieren, untersuchten Kwiatkowski und Noble des His(146) Hämoglobin. Unter der Annahme, daß der pK-Wert 7.8 dieser Gruppe zugeordnet werden kann, wurde versucht, ihre Ergebnisse mit nur zwei titrierbaren Gruppen (pK = 6.6 und 5.8) zu simulieren. Die berechnete pH-Abhängigkeit der Sauerstoffdissoziationskonstante zeigt eine gute Übereinstimmung mit den gemessenen des(His 146 β)-Hämoglobin-Daten. Darum ist der Schluß, daß der pK-Wert von 7.8 in Oxyhämoglobin His HC3(146 β) zuzuordnen ist, möglich.

Mit Hilfe der oben ermittelten Reaktionskonstanten l_4 bzw. l'_4 ist es möglich, den Unterschied zwischen den Aktivierungsenergien der einzelnen Titrationszustände mit einem einfachen Arrhenius-Modell zu berechnen. Für die Sauerstoffdissoziation beträgt der Unterschied der Dissoziationsenergie zwischen dem zweifach protonierten Zustand C_{011} und dem deprotonierten Zustand C_{000} $\Delta G = 3.5 \text{ kJ/Mol}$. Im Vergleich dazu ergibt die Protonierung von des-His146 β , C_{001} , einen geringen Beitrag von nur 0.067 kJ/Mol . Das deutet auf die wichtige Rolle des zweiten Protonierungsprozesses mit dem pK-Wert 6.6 hin. Allerdings ergibt die O_2 -Dissoziation von des(His146 β)Hb eine Energiedifferenz von 1.16 kJ/Mol für die beiden Titrationszustände der pK = 6.6-Protonierung. Somit kann auf einen bedeutenden Einfluß von His146 β auf den Titrationszustand C_{011} geschlossen werden, obwohl der direkte

Tabelle 6: Dissoziations- und Assoziationskonstanten

a) O₂ -Dissoziation

$$l_4(000) = 10.7 \text{ sec}^{-1}$$

$$l_4(100) = 11.0 \text{ sec}^{-1}$$

$$l_4(010) = 16.0 \text{ sec}^{-1}$$

$$l_4(110) = 43.8 \text{ sec}^{-1}$$

$$l_4(111) = 21.5 \text{ sec}^{-1}$$

b) CO -Dissoziation

$$l_4(000) = 4.1 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$$

$$l_4(100) = 4.5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$$

$$l_4(110) = 7.6 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$$

$$l_4(111) = 5.1 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$$

c) CO -Assoziation

$$l_4^1(000) = 10.9 \times 10^6 \text{ sec}^{-1} \text{M}^{-1}$$

$$l_4^1(100) = 11.2 \times 10^6 \text{ sec}^{-1} \text{M}^{-1}$$

$$l_4^1(110) = 3.7 \times 10^6 \text{ sec}^{-1} \text{M}^{-1}$$

$$l_4^1(111) = 7.7 \times 10^6 \text{ sec}^{-1} \text{M}^{-1}$$

Tabelle 7: Die berechneten Gleichgewichtskonstanten K_4^μ ($\mu=1,2,3$)
und die dazugehörigen Differenzen der freien Energie
für die CO -Bindung der 4. Untereinheit im Hämoglobin

$$K_4^1 = 1.2 \times 10^{-9} \text{ M}$$

$$K_4^2 = 4.9 \times 10^{-10} \text{ M}$$

$$K_4^3 = 7.1 \times 10^{-10} \text{ M}$$

$$G_{K4}^1 = +44.3 \text{ kJ}$$

$$G_{K4}^2 = -45.1 \text{ kJ}$$

$$G_{K4}^3 = -45.4 \text{ kJ}$$

Beitrag zur pH-Abhängigkeit der Sauerstoffdissoziation sehr klein ist. Dieser indirekte Einfluß wird in 5.4.3. diskutiert.

Ein anderer wichtiger Aspekt der Kinetikmessungen ist die pH-Abhängigkeit der CO-Bindungs-Gleichgewichtskonstanten $K = \frac{l_4}{l_4'}$. Es gibt also eine pH-abhängige Bindungsaffinität, obwohl keine pK-Verschiebung der titrierbaren Gruppen (His146 β) festgestellt wurde. Dies steht im Widerspruch zur klassischen Interpretation des Bohreffektes (s. 1.2.4.). Darum wird im folgenden unter Berücksichtigung der Erhaltung der freien Energie ein neues Modell vorgeschlagen, um die Abhängigkeit der Ligandierung der vierten Untereinheit vom pH-Wert zu erklären (Schweitzer-Stenner et al. 1985).

1. Der nicht ligandierte Deoxyzustand wird durch die Titrationszustände C_{ijK}^u repräsentiert (u = unligandiert, $i, j, K = 3$ mögliche Titrationen, s. Kap. 3)
2. Bei der Ligandierung des Oxyzustandes C_{ijK}^L geht dieser in zwei unterschiedliche Tertiärstrukturen über, die im Gleichgewicht stehen, $C_{ijK}^{L_1}$ und $C_{ijK}^{L_2}$ (im sauren Bereich $C_{ijK}^{L_2}$). Das gilt nicht für die Titrationszustände C_{i10}^L und C_{o10}^L . Die Ligandierung $C_{ijK}^u \rightarrow C_{ijK}^{L_1}$ und $C_{ijK}^{L_2}$ wird deshalb durch zwei Affinitätskonstanten $K = \frac{l_4^\mu}{l_4'^\mu}$ ($\mu = 1, 2, 3$) beschrieben. Die beiden Tertiärstrukturen können durch Tyr HC2(145) β erklärt werden. Nach Shaanan (1983) nimmt das Tyrosin im OxyHb zwei unterschiedliche Positionen ein, davon ähnelt eine sehr der Position im DeoxyHb.

Anschaulich wird dieses Modell durch die Abb. 26 beschrieben (C_{001} und C_{101} liefern zu vernachlässigende Beiträge). Links sind die Beiträge des Deoxyzustandes, rechts die Beiträge des Oxyzustandes aufgezeigt. Dabei sind jeweils links die freien Energieniveaus der unterschiedlichen Titrationszustände aus Abb. 11 und rechts die Energieaufspaltung der Titrationszustände dargestellt. Die Besetzungszahlen $n(C_{ijK}^u)$ und $n(C_{ijK}^{L_\mu})$ können

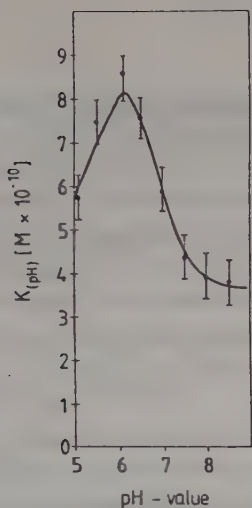


Abb. 25: pH -Abhängigkeit der Ligan- denaffinität in der 4. Unter- einheit des Hb's.

(Die Daten stammen aus Messungen von DeYoung et al (1976)), die durchgezogene Linie wurde ge- fittet.)

unliganded state

liganded state

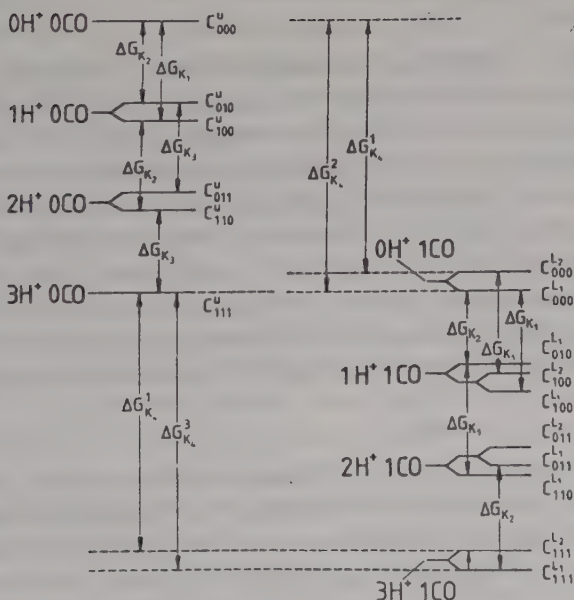


Abb. 26: Energieniveaus der freien Energie für die Protonierung $C_{u,u}$ der unligandierten(u) und ligandierten(L) Zustände. Die Differenz der freien Energie $\Delta G_{K_1}, \Delta G_{K_2}, \Delta G_{K_3}$ bezieht sich jeweils auf die Gleichgewichtskonstanten $K_{K_1}, K_{K_2}, K_{K_3}$.

mit Glg. 39 und dem Massenwirkungsgesetz für $C_{\text{LJK}}^{\text{u}}$ und $C_{\text{LJK}}^{\text{LM}}$ berechnet werden. Die Gleichgewichtskonstante $K_4(\text{pH})$ ergibt sich dann zu:

$$K(\text{pH}) = \frac{\sum_{\text{LJK}} n(C_{\text{LJK}}^{\text{u}}) [\text{CO}]}{\sum_{\mu=1}^3 \sum_{\text{LJK}} n(C_{\text{LJK}}^{\text{LM}})} = \frac{[\text{Hb}(\text{CO})_3] [\text{CO}]}{[\text{Hb}(\text{CO})_4]}$$

Die so definierte Gleichgewichtskonstante setzt sich aus verschiedenen Beiträgen $K_v^{\mu} = \frac{e_{4v}^{\mu}}{e_{4v}^{\mu'}}$ gemäß der verschiedenen Titrationszustände zusammen. Die Ergebnisse eines Fits, in dem die K_v^{μ} als Parameter dienen, sind durch die durchgezogene Linie in Abb. 25 dargestellt. Die dazugehörigen Werte sind in Tab. 7 aufgeführt. Aus diesen Werten kann ein Energiegewinn von 2.3 kJ/Mol für die CO-Ligandierung im alkalischen Bereich (pH = 8.0) im Vergleich zum selben Prozeß bei pH = 6.0 abgelesen werden. Im sauren Bereich pH = 5.0 liegt wieder ein leichter Gewinn von 1.3 kJ/Mol vor.

Zusammengefaßt ergibt sich folgendes Bild. Die pH-Abhängigkeit der CO-Bindung in der vierten Untereinheit kann nicht durch eine Verschiebung der pK-Werte der titrierbaren Gruppen, die die Dissoziations- und Assoziationseigenschaften beeinflussen, beschrieben werden, da die dazugehörigen Konstanten identische pK-Werte hätten. Deshalb wurde hier ein Modell entwickelt, in dem einige Titrationszustände nach der Ligandierung in zwei verschiedene Tertiärstrukturen übergehen, das wird durch zwei verschiedene Gleichgewichtskonstanten beschrieben. Damit wurde es möglich die pH-Abhängigkeit der experimentell erhaltenen Ligandenaffinität zu erklären.

Die aus den Ramanmessungen und kinetischen Messungen übereinstimmend erhaltenen pK-Werte spiegeln die gemeinsame Ursache für die Veränderungen der Hämssymmetrie und Veränderungen der Assoziations- und Dissoziationskonstante wider.

5.5.3. Vergleich der Raman- und Kinetikdaten mit NMR-Daten

Im folgenden Kapitel soll aufgezeigt werden, inwieweit die Interpretation der Messungen von Russu et al. und Perutz et al. mit den vorliegenden Daten übereinstimmen.

Zuerst werden die Daten von Russu et al. mit dem vorliegenden Modell zum Bohreffekt diskutiert. Dann wird gezeigt, daß auch mit den Perutz'schen Daten dieses Modell in modifizierter Form gültig bleibt.

5.5.3.1. Ergebnisse von Russu et al.

Im Russu'schen Bild wird der pK-Wert von 7.8 dem His HC3(146) zugeordnet, d.h. die Salzbrücke His HC3(146)β - Asp FG1(94)β bleibt, wenn auch nur für niedrige Cl⁻-Konzentrationen, bei der Oxygenierung des Hämoglobins erhalten, damit wäre das Fehlen des zentralen Kopplungsmechanismus für Cl⁻-Konzentrationen oberhalb 0.3 Mol/l verständlich. Diese Salzbrücke legt das terminale Ende His146β in einer starren Position fest. Im Gegensatz dazu befindet es sich in einem frei rotierbaren Zustand bei dem Bruch der Salzbrücke. Dieser Aspekt wird wichtig für den Einfluß der Aminosäuren, deren Beitrag durch den pK-Wert von 6.6 wiedergegeben wird. Aus den Messungen von Kwiatkowski und Noble (1982) folgte, daß dieser Wert durch Tyr HC2(145)β verursacht wird, obwohl freies Tyrosin selbst erst bei einem pH-Wert von 10.0 deprotoniert (Schulz und Schirmer, 1978), darum sollte eine Gruppe in der Nachbarschaft des Tyrosins berücksichtigt werden. His HC3(146)β wäre ein solcher Kandidat, weil bei desHis-OxyHb der Einfluß der pK = 6.6-Gruppe zurückgeht.

Tyrosin bildet nach Shaanan (1983) im OxyHb eine Wasserstoffbrücke zum Val FG5(98)β, die in zwei Konformationen existiert. Ein Nachbar des Val FG5(98)β ist His FG4(97)β. Für dieses Histidin hat Ohm et al. (1978) im Myoglobin einen pK-Wert zwischen 6.6 und 6.8 bestimmt. Durch die Protonierung dieser Gruppe kann die Konformation der H-Brücke geändert werden, weil

deren Bindungseigenschaften stark von den elektrostatischen Eigenschaften der Umgebung abhängen (Zundel 1976, 1982), s. 1.1.3. Damit wäre eine zweite Aminogruppe gefunden, die den pK-Wert von 6.6 verursachen könnte.

Der pK-Wert von 5.8 sollte dem distalen Histidin (E7) zugeordnet werden (Ohm, 1979). Durch die Identifizierung der zu den pK-Werten gehörigen Gruppen in niedrigen Cl^- -Konzentrationen ist es möglich, eine Erklärung für die folgenden 2 Effekte zu erhalten:

- Die Energieaufspaltung der protonierten Zustände bei der Ligandierung (Abb. 26), welche durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den beiden Konformationen der Wasserstoffbrücke des Tyrosins zum Valin entstehen.
- Den starken Einfluß des His HC3(146) β auf den zu pK = 6.6 gehörigen Titrationszustand.

Das Tyrosin HC2(145) β nimmt nach Shaanan (1983) im OxyHb zwei verschiedene Zustände ein. Die eine Position ähnelt der Position im DeoxyHb. Die unterschiedlichen Positionen führen zu zwei Konfigurationen der Wasserstoffbrücke, die eine Konfiguration gehört wie im DeoxyHb zu einer niedrigen Ligandenaffinität und die andere wie im OxyHb zu einer hohen Ligandenaffinität. Das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Konfigurationen wird durch die Protonierung bei pK = 6.6 verschoben.

Oberhalb pH = 7.8 besteht die Salzbrücke nicht. Die dazugehörige Protonierung C_{OOH} hat, wie in 5.5.2. beschrieben, sowohl eine hohe wie eine niedrige Ligandenaffinität, deshalb sollte ein Gleichgewicht zwischen den beiden Konfigurationen der Wasserstoffbrücke vorliegen. Es unterscheidet sich kaum von der zwischen pH 6.6 und pH = 7.8 mit bestehender Salzbrücke, da fast die gleiche Ligandenaffinität vorliegt. Unterhalb pH = 6.6 dominiert die Konfiguration mit niedriger Ligandenaffinität, d.h. der pK-Wert von 6.6 verschiebt das Gleichgewicht zwischen den beiden Konfigurationen der Wasserstoffbrücke, existiert His HC3(146) β und

die Salzbrücke nicht, verliert dieser pK-Wert an Einfluß.

Bislang wurde ein Modell für den Bohreffekt vorgestellt, das im Einklang mit den Daten von Russu et al. ist. Auch mit den Daten von Perutz et al. (1985) ist es möglich, die Kinetikmessungen von Kwiatkowski und Noble zu erklären, die Titration läuft allerdings dabei etwas anders ab.

5.5.3.2. Ergebnisse von Perutz et al.

Perutz ordnete dem pK-Wert von 7.6 dem His FG4(97) β zu, damit bleibt seine Erklärung des Bohreffekts (s. 1.3.4.) weiter gültig. Bei der Oxygenierung bricht die Salzbrücke und der pK-Wert des His HC3(146) β sinkt deutlich ab, so daß ein Bohr-Proton abgegeben wird. Er begründet die Zuordnung mit Arbeiten von Hol et al. (1978, 1982). Demnach besitzen helikale Bereiche ein Dipolmoment. Das negative Ende solch eines Dipols wäre beim His FG4(97) β und führt dort zur Änderung des pK-Wertes. Allerdings wird dieser hohe pK-Wert im Myoglobin von Ohm et al. (1979) nicht gefunden, obwohl sich auch dort das Histidin am Ende eines helikalen Bereichs befindet.

Nach Perutz führt im OxyHb die (De)Protonierung von His FG4(97) β mit einem pK-Wert von 7.6 (Raman- und Kinetikmessungen 7.8) zu Veränderungen in der empfindlichen FG-Helix. Der pK-Wert von 5.8 wird weiterhin dem distalen Histidin F8 zugeordnet. Schwieriger wird die Zuordnung des pK-Wertes von 6.6. Er gehört aber weiterhin, wie im vorigen Kapitel beschrieben, zu einem Titrationsprozeß, der starken Einfluß auf die Wasserstoffbrücke Tyr HC2(145) - Val FG5(98) β hat, wahrscheinlich ein benachbartes Histidin, z.B. His H21(143) β . Er kann nicht alleine dem pK-Wert von His HC3(146) β zugeordnet werden, da dieser pK-Wert auch im desHis-OxyHb auftritt.

Für desHis-OxyHb fordern Perutz et al. aufgrund ihrer NMR-Messungen zwei verschiedene Konfigurationen mit pK-Werten von 7.6 und

6.6, wobei der Beitrag der Konfiguration mit $pK = 7.6$ mit steigender Ionenstärke ($[Cl^-] > 0.06 \text{ Mol/l}$) abnimmt. Somit bleiben nur noch die pK -Werte von 6.6 und 5.8 übrig, im Einklang mit den Kinetikdaten fehlt der pK -Wert von 7.6 (7.8). Die Zuordnung der beiden pK -Werte muß zu denselben Aminosäuren erfolgen wie im OxyHb.

Es erhebt sich aber die Frage, wie sich die Tatsache erklären läßt, daß bei Cl^- -Konzentrationen höher als 0.3 Mol/l der zentrale Kopplungsmechanismus ausfällt. Möglich ist ein indirekter Einfluß über His HC3(146) β bzw. Lys HC1(144) β . Nach Shaanan (1983) bildet die Carboxylgruppe des Histidins mit dem Lysin eine Wasserstoffgruppe. Durch die Erhöhung der Chloridkonzentration über 0.3 Mol/l wird die positive Ladung des Lysins abgeschirmt (Perutz et al. 1985). Man kann die Wasserstoffbrücke brechen und Cl^- an das Lysin angelagert werden. Durch den Bruch dieser Wasserstoffbrücke hebt die Carboxylgruppe den pK -Wert des Imidazols an.

Wenn man die beiden Konfigurationen der Wasserstoffbrücke Tyr HC2(145) β - Val FG5(98) β für die Variation der 1375 cm^{-1} Linie verantwortlich macht, wäre über das zum Tyrosin benachbarte Lysin eine Stelle gefunden, an der das Chloridion einen Einfluß auf das Verhalten der 1375 cm^{-1} Linie nimmt. Möglicherweise kann das Tyrosin durch das veränderte elektrostatische Verhalten seiner beiden Nachbarn nur noch eine seiner Positionen einnehmen, so daß nur noch eine Konformation der Wasserstoffbrücke vorliegt, damit würde die Variation der 1375 cm^{-1} Linie entfallen.

Eine abschließende Erklärung, welches Modell - das von Perutz et al. oder das von Russu et al. - unsere Ergebnisse besser beschreibt, kann nicht gegeben werden. Interessant wäre vor allem die Stellungnahme von Russu et al. zu der zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht veröffentlichten Arbeit von Perutz et al.

Aus den vorliegenden RRS-Messungen wird aber deutlich, daß die FG-Helix einen maßgeblichen Einfluß auf die pH-Abhängigkeit des R-Zustandes und die Hämoglobinfunktion ausübt. Darum wurde zum Schluß ein System untersucht, das diesen Bereich zwar modifiziert, aber nicht wie das BME blockiert.

5.6. NES-Oxyhämoglobin

NES-OxyHb zeigt zwischen $\text{pH} = 6.0$ und $\text{pH} = 8.4$ starke Änderungen der Dispersion des Depolarisationsgrades für die 1375 cm^{-1} - und für die 1638 cm^{-1} -Linie. Hier wird die Titration der Aminosäuren sowohl peripher als auch zentral an die Hämgruppe weitergeleitet, dabei soll hier besonders darauf hingewiesen werden, daß es ein zentrales Koppeln auch ohne die Salzbrücke Asp FG1(94) β - His HC3(146) β gibt.

Im Gegensatz zum BME-OxyHb werden Cys F9(93) β und His FG4(97) β nicht starr miteinander verbunden, sondern haben durch eine Wasserstoffbrücke (s. Abb. 4) einen flexiblen Kontakt, der durch Titration von His FG4(97) β unterbrochen werden kann. Wie im unmodifizierten Hämoglobin bleibt die Wasserstoffbrücke zwischen Tyr HC2(145) β und Val FG5(98) β ohne Veränderung der Position von Tyr HC2(145) β bestehen (Moffat, 1970), so daß hier zwei Wasserstoffbrücken vorliegen, die die Symmetrie der Hämgruppe beeinflussen können.

His FG4(97) β hat nach Perutz et al. (1985) einen pK -Wert von 7.8. So könnte der in NES-OxyHb durch Messung des Depolarisationsgrades gefundene pK -Wert von 7.4 diesem Histidin zugeordnet werden.

Dieser Wert muß aber nicht notwendigerweise die NMR-Arbeiten von Perutz et al. (1985) am OxyHb unterstützen. Die Bildung der Wasserstoffbrücke im NES-OxyHb könnte diesen hohen pK -Wert auch erklären, da die Bildung von Wasserstoffbrücken und Salzbrücken den pK -Wert von Histidinen anhebt (Zundel 1976, 1982). Der Einfluß auf das Häm kann über das distale His F8(92) β erfolgen, so

daß die Veränderung auch zentral über das Eisen in die Hämgruppe eingekoppelt werden kann.

Der pK-Wert von 6.4 gehört zum relativ freien His HC3(146) β , das möglicherweise durch Titration die Wasserstoffbrücke Tyr HC2(145) β - Val FG5(98) β verändert.

Sowohl Val FG5(98) β_1 als auch His FG4(97) β_1 besitzen außerdem van-der-Waals-Kontakte zur β_2 Untereinheit (Perutz 1969). Veränderungen an diesen Aminosäuren können so Änderungen in die Quartärstruktur des Hämoglobins induzieren. Der pK-Wert von 8.7 kann nicht eindeutig zugeordnet werden. Er kann für eine einsetzende Dimerisierung stehen oder für ein Cystein (nicht Cys F9(93) β). Bei freien Cysteinen liegt der pK-Wert der Residue bei 8.33 (Tschesche, 1978). Im Hämoglobin liegen außer Cys F9(93) noch Cys G11(104) β und Cys G19(122) β vor. Cys G11(104) β_1 besitzt einen van-der-Waals-Kontakt zu Gln H5(127) α_1 (Perutz 1969). Allerdings konnte bei den Cysteinen bislang kein Einfluß auf die Hämoglobinfunktion nachgewiesen werden.

Ein scheinbarer Widerspruch ergibt sich zu den Messungen mit hohen Cl^- -Konzentrationen im Russu'schen Bild. Denn, obwohl die Salzbrücke fehlt, liegt bei NES-Hb ein zentraler Kopplungsmechanismus vor, wie die pH-Variation für die 1375 cm^{-1} -Linie zeigt.

Dieser Widerspruch wird aber aufgehoben, wenn man bedenkt, daß im NES-OxyHb im Gegensatz zum OxyHb die titrierbare Wasserstoffbrücke His FG4(97) β - Cys F9(93) β existiert. Diese Wasserstoffbrücke ist für die pH-Variation der 1375 cm^{-1} -Linie verantwortlich.

Abschließend läßt sich folgendes zusammenfassen: Auch ohne Salzbrücke His HC3(146) β - Asp FG1(94) β gibt es zwischen Protein und Häm eine zentrale und eine periphere Kopplung. Wichtig für die pH-Abhängigkeit des R-Zustandes im NES-OxyHb ist His FG4(97) β . So bestätigen auch diese Messungen, daß den Aminosäuren in der FG-Helix eine Schlüsselrolle zum Verständnis der Hämoglobinfunktion zukommt.

6. Ausblick

Im vorigen Kapitel wurde die Bedeutung der Meßergebnisse für das Verständnis der Hämoglobinfunktion diskutiert. Um in der Diskussion zwischen Perutz et al. und Russu et al. Stellung beziehen zu können, ist noch eine Messung von desHis(146)β-OxyHb in Abhängigkeit von pH-Wert und Chloridkonzentration notwendig. Es ist dann möglich, falls das Bild von Perutz richtig ist, die beiden Konformationen des His FG4(97)β nachzuweisen.

Erwähnenswert ist auch, daß alle beschriebenen Titrations nur in den β-Untereinheiten stattfinden. Hämoglobin besitzt aber auch zwei α-Untereinheiten, deren allosterische Funktion weitestgehend unbekannt ist. Darum sollten Messungen an isolierten α- und β-Untereinheiten vorgenommen werden, um hier mehr Klarheit zu schaffen.

Eine meßtechnische Verbesserung, die zu besser gesicherten Ergebnissen bei der Fitprozedur führt und mit der die alten Ergebnisse überprüft werden, ist durch den Einsatz eines kontinuierlich durchstimmbaren Farbstofflasers möglich.

Neben neuen technischen und biochemischen Verfahren soll auch ein physikalischer Aspekt nicht vergessen werden. Aus den Messungen der Depolarisationsgrade und Anregungsprofile werden Fitkonstanten gefunden, deren absolute Größe willkürlich ist, da die Intensität der resonanten Ramanstreuung im Hämoglobin unbekannt ist. Deshalb ist eine Bestimmung des Streuquerschnitts des Hämoglobins notwendig (Cardona 1982). Wenn die absolute Größe der Fitkonstanten bekannt ist, ist es möglich, mit einer Rechnung die Größe der statischen Verzerrungen δQ abzuschätzen.

Nach Glg. 33 besteht folgender Zusammenhang zwischen Fitkonstanten und statischen Verzerrungen:

$$c = \langle e^{i \frac{\partial H}{\partial Q^{\text{rR}}} \big|_{\delta Q_i=0}} | s \rangle + \sum \langle e^{i \frac{\partial^2 H}{\partial Q^{\text{rR}} \partial Q^{\text{rJ}}} \big|_{\delta Q_i=0}} | s \rangle \cdot \delta Q^{\text{rJ}}$$

Sind die beiden Matrixelemente bekannt, kann man auf die statischen Verzerrungen δQ^N schließen. Ein Lösungsvorschlag für die Berechnung dieser Matrixelemente ist im folgenden aufgeführt.

Die Auslenkung $\Delta \vec{r}_i$ aller Kerne des Porphyrins liegen in der x-y-Ebene. Zwischen den Auslenkungen und den (3N-6) Normalkoordinaten Q_k besteht folgende Beziehung:

$$\begin{pmatrix} \Delta x_1 \\ \Delta y_1 \\ \vdots \\ \Delta x_N \\ \Delta y_N \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} t_{x_1}^1 t_{x_2}^1 & \dots & t_{x, 3N-6}^1 \\ t_{y_1}^1 t_{y_2}^1 & \dots & t_{y, 3N-6}^1 \\ \vdots & & \vdots \\ t_{x_1}^N t_{x_2}^N & \dots & t_{x, 3N-6}^N \\ t_{y_1}^N t_{y_2}^N & \dots & t_{y, 3N-6}^N \end{pmatrix} \begin{pmatrix} Q_1 \\ \vdots \\ Q_{3N-6} \end{pmatrix}$$

Die t_{xi} , t_{yi} der Normalschwingungen sind von Abe (1978) für Nickeloctaethylporphyrin ausgerechnet worden. Sie können mit der Einschränkung der Genauigkeit für Protoporphyrin IX verwendet werden.

Für die Elektron-Phonon-Wechselwirkung gilt

$$H(q, e) = \sum_S \frac{2 a_S}{[(x_S^0 - \sum_{\tau} t_{x_{\tau}}^S Q_{\tau} - x_e)^2 + (y_S^0 - \sum_{\tau} t_{y_{\tau}}^S Q_{\tau} - y_e)^2 + z_e^2]^{1/2}}$$

S ist die Summation über alle Kerne

Q_{τ} beinhaltet die Ladungen und die effektiven Kernladungszahlen

x_e, y_e, z_e sind die Elektronenkoordinaten

x_S^0, y_S^0 sind die Gleichgewichtskoordinaten der Kerne

Nach der Berechnung von $\frac{\partial H}{\partial Q}$ und $\frac{\partial^2 H}{\partial Q^N \partial Q^N}$ sind die Matrixelemente zu bilden. Dafür werden die $|s\rangle, |e\rangle = |Q\rangle, |B\rangle$, wie im Anhang beschrieben, in Einelektronwellenfunktionen zerlegt. Alle weiteren Betrachtungen gelten allerdings nur für $|Q\rangle \rightarrow |Q\rangle$ Übergänge (s. 5.1.).

Für die Molekülorbitale gilt:

$$|\psi^n\rangle = \sum_s C_s^n |\varphi_s\rangle$$

$|\varphi\rangle = \text{Atomorbitale}$

Für das Protoporphyrin werden für die $|\psi\rangle$ nur die p-Orbitale berücksichtigt, da nur sie zu den Π -Orbitalen beitragen. Die Koeffizienten C_s^n sind für a_{2u} , a_{1u} , b_{1u} , b_{2u} , e_{gx} , e_{gy} -Orbitale von Hsu (1970) tabelliert. Damit lassen sich die Matrixelemente in folgende Terme zerlegen

$$\sum_{s', s''} C_{s'} C_{s''} g(t_{x_i}, t_{x_j}, t_{y_i}, t_{y_j})^s \langle \varphi_{s'} | f(\pi) | \varphi_{s''} \rangle$$

Nachdem sämtliche Koeffizienten und die Formeln in den Rechner eingegeben worden sind, traten folgende Schwierigkeiten bei der Auswertung auf.

Die Größe des Entmischungsparameter γ (s. 2.3.2. und Anhang) ist für Hämoglobin unbekannt. Ihn muß man aber kennen, um die zu berechnen.

Für $\langle r^{-3} \rangle$ sind die Erwartungswerte für Stickstoff und Kohlenstoff von Fraga (1976) berechnet und tabelliert worden. Es fehlt noch die Berechnung der Erwartungswerte, wenn $\varphi_{s'}$ und $\varphi_{s''}$ zu benachbarten Atomen gehören.

Abschließend läßt sich sagen, daß eine exakte Berechnung der Matrixelemente nicht möglich ist, wohl aber eine Abschätzung für die einzelnen Ramanlinien, so daß sich das Problem der zentralen und peripheren Kopplungsmechanismen für die 1375 cm^{-1} - und die 1638 cm^{-1} -Linie genauer quantifizieren läßt.

Die neuen biochemischen und physikalischen Problemstellungen machen deutlich, daß die resonante Ramanspektroskopie an Hämproteinen auch für die Zukunft ein fruchtbares Gebiet für weitere Forschungsarbeiten bleibt.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Messungen der Dispersion des Depolarisationsgrades zweier Ramanlinien des Oxyhämoglobinspektrums für die folgenden Modifikationen des OxyHb-Moleküls vorgestellt:

- Veränderungen der elektrostatischen Wechselwirkung des Proteins durch Variation des pH-Wertes und der Cl^- -Konzentration
- Veränderung der struktursensitiven FG-Helix durch den Einbau von Reagentien (BME-OxyHb und NES-OxyHb).

Die Ramanlinien bei 1375 cm^{-1} und bei 1638 cm^{-1} zeigen eine deutliche Variation dieser Dispersion mit dem pH-Wert.

Die Dispersion erfolgt aufgrund von Verzerrungen δQ^r der Hämgruppe aus der idealen D_{4h} -Symmetrie. Die Verzerrungen setzen sich aus symmetrieklassifizierten Verzerrungen zusammen, die sich wie A_{1g} , A_{2g} , B_{1g} und B_{2g} transformieren. Zur vollständigen Beschreibung der Messungen wurde die Einführung eines nicht ramanaktiven μ -ten Phonons und damit die Erweiterung zur 5. Ordnung zeitabhängigen Störungstheorie der Ramanstreuung notwendig. Die Anpassung der Messungen von Depolarisationsgrad und Anregungsprofilen mit dieser Theorie führt zu Fitkonstanten, die linear von Verzerrungen der Hämgruppe abhängen.

Die Änderung des pH-Wertes führt über die Titration einzelner Aminosäuren zu Änderungen in der Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins, die schließlich über Häm-Apoprotein-Wechselwirkung Verzerrungen in der Hämgruppe induzieren. Die hier dargestellte Methode ist somit geeignet, den Einfluß dieser Aminosäuren auf die Hämgruppe zu untersuchen.

Die vorliegenden Messungen zeigen, daß im BME-Oxyhämoglobin, in dem die Beweglichkeit der F-FG-Helix stark eingeschränkt ist und das keinen Bohreffekt aufweist, die pH-Variation der Dispersion des Depolarisationsgrades fehlt. Es besteht also ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Titration von Aminosäuren, die zu zusätzlichen Verzerrungen in der Hämgruppe und damit zur Veränderung der Dispersion des Depolarisationsgrades führen und den Titrationen, die zum Bohreffekt beitragen.

Um den Einfluß der Cl^- -Konzentration, die den Bohreffekt verstärkt und vermindert, zu untersuchen, wurden die pH-Variationen des Depolarisationsgrades für unterschiedliche Cl^- -Konzentrationen gemessen. Dabei ist festgestellt worden, daß bei der Dispersion des Depolarisationsgrades der 1375 cm^{-1} Linie oberhalb einer Cl^- -Konzentration von 0.3 Mol/l die pH-Abhängigkeit fehlt, während die 1638 cm^{-1} Linie noch deutliche Variationen zeigt.

Die beiden ausgewerteten Ramanschwingungen bei 1375 cm^{-1} (A_{1g}) und 1638 cm^{-1} (B_{1g}) reagieren verschieden auf Störungen im Protein. Die 1375 cm^{-1} Linie ist sensitiv für Störungen, die zentral über die kovalente Bindung Eisen-Histidin F8(92) β in das Porphyrin eingekoppelt werden. Die 1638 cm^{-1} Linie reagiert empfindlich auf Störungen, die über die Seitenketten der Hämgruppe eingekoppelt werden.

Bei hohen Cl^- -Konzentrationen fällt ein Triggermechanismus (z.B. das Aufbrechen der Salzbrücke His HC3(146) β - Asp FG1(94) β (Russu, 1980)) der 1375 cm^{-1} -Linie aus.

Parallel hierzu verschieben sich pK-Werte von Aminosäuren durch die Cl^- -Bindung. Um solche Verschiebungen zu ermitteln, wurde ein Titrationsmodell entwickelt, mit dem die pH-Abhängigkeit der Fitkonstanten wiedergegeben werden konnte. Die entsprechenden Rechnungen ergaben die pK-Werte 5.8, 6.6 und 7.8 für niedrige und pK = 6.2, 6.6 und 8.2 für hohe Cl^- -Konzentrationen.

Würde nach Russu der pK-Wert von 7.8 der Salzbrücke zugeordnet, so wäre, weil dieser Wert bei hohen Cl^- -Konzentrationen ausfällt, ein möglicher Triggermechanismus gefunden. Allerdings wird dem pK-Wert 7.8 nach neueren Messungen von Perutz et al. das His FG4(97) β zugeordnet.

Die zusätzliche Auswertung der Ergebnisse von Kwiatkowski und Noble (1982), die die pK-Werte der Ramanmessungen bestätigten, führten schließlich zu einem modifizierten Modell des Bohreffekts, in dem der Wasserstoffbrücke Tyr HC2(145) β -Val FG5(98) eine Schlüsselrolle zugewiesen wird. Diese Wasserstoffbrücke liegt in zwei Konformationen vor. Der pH-Wert verschiebt das Gleichgewicht zwischen beiden Konformationen. Bei hohen Cl^- -Konzentrationen besteht nur noch eine der beiden Konformationen, das führt zum pH-unabhängigen Verhalten der 1375 cm^{-1} Linie.

Eine endgültige Entscheidung, ob der gefundene pK-Wert von 7.8 der Salzbrücke His HC3(146) β -Asp FG1(94) β oder dem His FG4(97) zugewiesen werden kann, ist nicht möglich. Aber beide Fälle stehen ebenso wie die Wasserstoffbrücke Tyr HC2(144) β -Val FG5(9) und das BME für die dominante Rolle der FG-Helix bei der pH-Variation des Depolarisationsgrades, da bei allen ein direkter Einfluß auf diesen Bereich der β -Helix vorliegt.

Belegt wird dieser Sachverhalt zusätzlich durch die Messungen an NES-Oxyhämoglobin, das in diesem Bereich der F-FG-Helix eine titrierbare Wasserstoffbrücke aufweist. Diese Titration ergab eine starke Variation des Depolarisationsgrades mit dem pH-Wert. Der Wasserstoffbrücke konnte ein pK-Wert von 7.4 zugewiesen werden.

Im Widerspruch zum klassischen Modell des Bohreffekts, in dem der R- und T-Zustand pH-unabhängig sind und nur der Übergang zwischen beiden Zuständen vom pH-Wert gesteuert wird, zeigt das Ergebnis aller vorliegenden Messungen einen pH-abhängigen R-Zustand im Hämoglobin.

Literaturverzeichnis

- Abe, M., Kitagawa, T., Kyogoku, Y.: J. Chem. Phys. 69
10 (1978)
- Atonini, E., Brunori, M.: "Hemoglobin and Myoglobin in
Their Reactions with Ligands", American Elsevier,
New York (1971)
- Arnone, A.: Nature 237, 147 (1972)
- Asher, S.: Methods in Enzymology 76, 371 (1981)
- Benesch, R.E., Benesch, R.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
59, 526 (1968)
- Brunzel, U.: Diplomarbeit, Universität Bremen (1985)
- Cardona, E.: "Light Scattering in Solids", Springer
-Verlag, Berlin (1982)
- Cheung, L.D., Yu, N.T., Felton, R.H.: Chem. Phys. Let.
55, 527 (1978)
- Collins, D.W., Fitchen, D.B., Lewis, A.: J. Chem. Phys.
59, 5714 (1973)
- Deb, S.K., Bansol, M.L., Roy, A.P.: Appl. Spectrosc. 98
500 (1984)
- DeBruin, S.H., Janssen, L.H.M., van Os, G.A.J.: Biochem.
Biophys. Res. Commun. 55, 193 (1973)
- DeYoung, A., Pennely, R.R., Tan-Wilson, A., Noble, R.W.:
J. Biol. Chem. 251, 6692 (1976)
- Dolphin, W.: "The Porphyrins", Vol 1, "Structure and
Synthesis", Part A, Academic Press, New York (1978)
- El Naggar, S.: Dissertation, Universität Bremen (1984)
- El Naggar, S., Schweitzer-Stenner, R., Dreybrodt, W.,
Mayer, A.: Biophys. Struct. Mech. 10, 257 (1984)
- El Naggar, S., Dreybrodt, W., Schweitzer-Stenner, R.:
Eur. Biophys. J. 12, 43 (1985)
- Englander, J.J., Rogero, J.R., Englander, S.W.: J. Mol.
Biol. 169, 325 (1983)

- Fraga, S., Saxena, K.M.S., Karwowski, J.: "Handbook of Atomic Data", Elsevier Sci. Publ. Comp. Amsterdam (1976)
- Frauenfelder, H., Petsko, G.A., Tsernoglou, D.: *Nature* 280, 559 (1979)
- Gouterman, M.: *J. Chem. Phys.* 30, 1139 (1959)
- Hofacker, G.L.: "Biophysik", 1.Aufl., S.161, Ed.:Hoppe,W., Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New-York (1978)
- Hol, W.G.J., van Duijnen, P.T., Berendsen, H.J.C.: *Nature* 273, 443 (1978)
- Hol, W.G.J., Halie, L.M., Sander, C.: *Nature* 294, 532 (1981)
- Hsu, M.C.: Thesis, University of Illinois (1970)
- Kilmartin, J.V., Wootton, J.F.: *Nature* 228, 766 (1970)
- Kilmartin, J.V., Hewitt, J.H.: *Cold Spring Harbour Sym.* 36, 311 (1971)
- Kilmartin, J.V., Breen, J.J., Roberts, G.C.K., Ho,C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*: 70, 1246 (1973)
- Kwiatkowski, L., Noble, R.W.: *J. Biol. Chem.* 257, 8891 (1982)
- Kwiatkowski, L., Noble, R.W.: *Fed. Proc.* 41, 651 (1982)
- Long, D.A.: "Raman Spectroscopy", McGraw-Hill Int. Book Comp. Great Britain (1977)
- Longuett-Higgins, H.C., Rector, L.W., Platt, R.I.: *J. Chem. Phys.* 18, 1174 (1950)
- Loudon, R.: "The Quantum Theory of Light", Clarendon Press, Oxford (1979)
- McClain, W.M.: *J. Chem. Phys.* 55, 2789 (1971)
- Moffat, J.K.: *J. Mol. Biol.* 58, 79 (1981)
- Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.-P.: *J. Mol. Biol.* 12, 88 (1965)

- Nagle, J.F., Morowitz, H.J.: Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A. 75, 298 (1978)
- Norne, J.E., Chiancone E., Forsén, S., Antonini, E.:
FEBS Let. 94, 410 (1978)
- O'Donnel, S., Mandaro, R., Schuster, T.M., Arnone, A.:
J. Biol. Chem. 254, 12204 (1979)
- Ohm, J.P., Hagemeier, H., Hayes, M.B., Cohen, J.S.:
Biochemistry 18, 1599 (1979)
- O'Rourke, P.E.: Thesis, Georgia Institute of Technology
(1983)
- Perutz, M.F., Muirhead, H., Cox, J.M., Goaman, L.C.G.,
Mathews, F.S., McGandy, E.L., Welb, L.E.: Nature
219, 29 (1968)
- Perutz, M.F.: Nature 228, 726 (1970)
- Perutz, M.F., Ten Eyck, L.F.: Cold Spring Harb. Symp.
36, 295 (1971)
- Perutz, M.F., Fermi, G., Shih, T.-b.: Proc. Nat. Acad.
Sci. U.S.A. 81, 4781 (1984)
- Perutz, M.F., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., Fogg, J.,
Shih, T.-b.: J. Mol. Biol. in press
- Peticòlas, W.L., Nafie, L., Stein, P., Fanconi, B.:
J. Chem. Phys. 52, 1576 (1970)
- Pettke, J.D., Maggira, G.M., Shipman, L.L., Christoffersen,
R.E.: J. Mol. Spec. 71, 64 (1978)
- Plazcek, G.: "Rayleigh-Streuung und Ramaneffekt" in:
Handbuch der Radiologie, Bd.6, Ed.: Marx, E.,
Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig (1934)
- Rollema, H.S., Jansen, H.M., deBruin, S.H., van Os, G.A.J.:
J. Biol. Chem. 250, 1333 (1975)
- Russu, I.M., Ho, N.T., Ho, C.: Biochemistry 19, 1043 (1980)
- Russu, I.M., Ho, N.T., Ho, C.: Biochemistry 21, 5031 (1982)

- Schpoliski, E.W.: "Atomphysik", 11.Aufl., VEB Verlag der Wissenschaften, Berlin (1973)
- Schulz, G.E., Schirmer, R.H.: "Principles of Protein Structure", Springer-Verlag, Berlin (1979)
- Schweitzer, R., Dreybrodt, W., Mayer, A., el Naggar, S.: J. Raman. Spectrosc. 13, 139 (1982)
- Schweitzer, R.: Dissertation, Universität Bremen (1983)
- Schweitzer-Stenner, R., Dreybrodt, W., el Naggar, S.: Biophys. Struct. Mech. 10, 241 (1984)
- Schweitzer-Stenner, R., Dreybrodt, W., Wedekind, D., el Naggar, S.: Eur. Biophys. J. 11, 61 (1984)
- Schweitzer-Stenner, R., Dreybrodt, W.: J. Raman Spectrosc. 16, 111 (1985)
- Schweitzer-Stenner, R., Wedekind, D., Dreybrodt, W.: zur Veröffentlichung eingereicht (Eur. Biophysic. J.)
- Shaanan, B.: Nature 296, 683 (1982)
- Shaanan, B.: J. Mol. Biol. 171, 31 (1983)
- Shelnutt, J.A.: J. Chem. Phys. 74, 6644 (1981)
- Simon, S.R., Königsberg, W.H., Bolton, W., Perutz, M.F.: J. Mol. Biol. 28, 451 (1967)
- Simon, S.R., Königsberg, W.H.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.: 56, 749 (1966)
- Tschesche, H.: "Biophysik", Ed.: Hoppe, W., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1978)
- Vinogradov, S.N., Linell, R.H.: "Hydrogen Bonding", van Nostrand Reinhold Comp., New York (1971)
- Volkenshtein, M.V.: "Biophyscs", Mir Publishers, Moskau (1983)
- Wedekind, D., Schweitzer-Stenner, R., Dreybrodt, W.: BBA in press
- Weißbluth, M.: "Hemoglobin", Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg - New York (1974)

Zundel, G.: "The Hydrogen Bond, Recent Developments in Theory and Experiments", Ed.: Schuster, G., Zundel, G., Vol 15, North Holland Publ. Co. (1976)

Zundel, G.: "Biophysik", Ed.: Hoppe, W., 2.Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1982)

Anhang

Matrixkopplungselemente im 4-Orbital Modell

Die rotierten Zustände im Einelektronenbild

Mit Glg.25 und Glg.22 ergeben sich die folgenden Ausdrücke:

$$Q'_x = \frac{1}{\sqrt{2}} [a_{2u} e_{gx} (\cos \nu - \sin \nu) + a_{1u} e_{gy} (\cos \nu + \sin \nu)]$$

$$Q'_y = \frac{1}{\sqrt{2}} [a_{2u} e_{gy} (\cos \nu - \sin \nu) - a_{1u} e_{gx} (\cos \nu + \sin \nu)]$$

$$B'_x = \frac{1}{\sqrt{2}} [a_{2u} e_{gx} (\cos \nu + \sin \nu) - a_{1u} e_{gy} (\cos \nu - \sin \nu)]$$

$$B'_y = \frac{1}{\sqrt{2}} [a_{2u} e_{gy} (\cos \nu + \sin \nu) + a_{1u} e_{gx} (\cos \nu - \sin \nu)]$$

$$\text{mit } WS = \frac{1}{\sqrt{2}} (\cos \nu + \sin \nu) \quad WD = \frac{1}{\sqrt{2}} (\cos \nu - \sin \nu)$$

lassen sich die Matrixelemente, unter der Berücksichtigung der Tatsache, daß

$$\langle a_{2u} e_{gx} | Op | a_{2u} e_{gx} \rangle = \langle e_{gx} | Op | e_{gx} \rangle - \langle a_{2u} | Op | a_{2u} \rangle,$$

in folgende Ausdrücke zerlegen

$$\begin{aligned} \langle Q'_{x,y} | Op | Q'_{x,y} \rangle &= (\langle e_{gx,y} | e_{gx,y} \rangle - \langle a_{2u} | a_{2u} \rangle) \times WD^2 \\ &+ (\langle e_{gy,x} | e_{gy,x} \rangle - \langle a_{1u} | a_{1u} \rangle) \times WS^2 \end{aligned}$$

$$\langle Q'_x | Q'_y \rangle = \langle e_{gx} | e_{gy} \rangle (WD^2 - WS^2)$$

$$\langle Q'_{x,y} | B'_{y,x} \rangle = \langle e_{gx,y} | e_{gy,x} \rangle 2 WS WD \mp \langle a_{2u} | a_{1u} \rangle (WD^2 + WS^2)$$

$$\langle Q'_{x,y} | B'_{x,y} \rangle = (\langle e_{gx,y} | e_{gx,y} \rangle - \langle e_{gy,x} | e_{gy,x} \rangle + \langle a_{1u} | a_{1u} \rangle - \langle a_{2u} | a_{2u} \rangle) WD WS$$

$$\langle B'_{x,y} | B'_{x,y} \rangle = (\langle e_{gx,y} | e_{gx,y} \rangle - \langle a_{2u} | a_{2u} \rangle) WS^2 + (\langle e_{gy,x} | e_{gy,x} \rangle - \langle a_{1u} | a_{1u} \rangle) WD^2$$

$$\langle B'_x || B'_y \rangle = \langle e_{gx} || e_{gy} \rangle (\omega_S^2 - \omega_D^2)$$

Zwischen den Einelektronenzuständen können jeweils nur Operatoren mit bestimmten Symmetrieeigenschaften koppeln. Sie sind im folgenden aufgeführt:

$$\langle e_{gx,y} | \rho^r | e_{gx,y} \rangle \quad \Gamma = A_{1g}, B_{1g}$$

$$\langle e_{gx} | \rho^r | e_{gy} \rangle \quad \Gamma = B_{2g}$$

$$\langle a_{1u} | \rho^r | a_{1u} \rangle, \langle a_{2u} | \rho^r | a_{2u} \rangle \quad \Gamma = A_{1g}$$

$$\langle a_{1u} | \rho^r | a_{2u} \rangle \quad \Gamma = A_{2g}$$

Deshalb können zwischen $\langle Q || Q \rangle$ bzw. $\langle B || B \rangle$ (Franck-Condon Übergänge) nur A_{1g} , B_{1g} , und B_{2g} - aber keine A_{2g} - Moden koppeln, während zwischen $\langle Q || B \rangle$ (Hertzberg-Teller Kopplung) alle vier Symmetriarten koppeln können.

Wäre $\nu=0$ (50:50 states), so wäre $\langle B || B \rangle = \langle Q || Q \rangle$. Diese Restriktion ist aber für $\nu \neq 0$ aufgehoben, allerdings bleibt das Verhältnis $\frac{C_{aa}^{A_{1g}}}{C_{bb}^{A_{1g}}} = \frac{C_{aa}^{B_{1g}}}{C_{bb}^{B_{1g}}}$ innerhalb des 4-Orbital Modells stehen.

Lebens- und Bildungsgang

- geboren am 5.9.1956 in Böklund, Kreis Schleswig-Flensburg, als Tochter der Eheleute Walter und Ingeborg Wedekind
- Besuch der Grundschule Böklund von 1963 bis 1967
- Besuch der Lornsenschule in Schleswig von 1967 bis 1975
- Abitur im Mai 1975
- Beginn des Studiums der Physik an der TU Hannover im Oktober 1975
- Vordiplom im Oktober 1977
- Abschluß des Studiums mit einer Diplomarbeit über das Thema "Magneto-optische Untersuchungen mit einem Farbzentrenlaser" im Institut für Angewandte Physik der Universität Hannover unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. W. Lange und Erwerb des Hauptdiploms (Dipl.-Physi) im Februar 1982
- Seit dem 1. September 1982 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Bremen. Seit dieser Zeit Arbeit an einer Promotion über Resonanzramanspektroskopie an Hämproteinen unter der Betreuung von Prof.Dr. W. Dreybrodt

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof.Dr. W. Dreybrodt für die engagierte Betreuung zur Durchführung der Promotion. Seine Anregung und seine ständige Diskussionsbereitschaft haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof.Dr. A. Mayer-Heinricy für die biophysikalische Betreuung meiner Arbeit.

Mein Dank gilt auch meinen Kollegen Herrn Dr. R. Schweitzer-Stenner für die vielen fruchtbaren Diskussionen und die freundschaftliche Unterstützung sowie Herrn Dr. S. el Naggar für die Hilfe bei der experimentellen und wissenschaftlichen Einarbeitung.

Für ein gutes wissenschaftliches und soziales Umfeld sorgten Herr Dr. D. Buhmann, die Dipl.-Physiker U. Brunzel, C. Köppen, H. Kugel, U. Pilatus, H.J. Schade, der Dipl.-Chemiker R. Düren sowie der Diplomand U. Kubitschek.

Bei der technischen Betreuung der Ramanapparatur halfen mir die Herren G. Ankele und H. Rohbeck. Bei der Präparation der Proben stand mir Frau C. Lamm mit ihren Kolleginnen zur Seite. Die meisten Zeichnungen in dieser Arbeit wurden von Frau G. Waschwill angefertigt. Getippt wurde sie von Frau B. Bödeker. Bei allen möchte ich mich bedanken.

